Den här texten är endast avsedd som ett dokumentationshjälpmedel och har ingen rättslig verkan. EU-institutionerna tar inget ansvar för innehållet. De autentiska versionerna av motsvarande rättsakter, inklusive ingresserna, publiceras i Europeiska unionens officiella tidning och finns i EUR-Lex. De officiella texterna är direkt tillgängliga via länkarna i det här dokumentet

►B

KOMMISSIONENS FÖRORDNING (EG) nr 440/2008

av den 30 maj 2008

om testmetoder enligt Europaparlamentets och rådets förordning (EG) nr 1907/2006 om registrering, utvärdering, godkännande och begränsning av kemikalier (Reach)

(Text av betydelse för EES)

(EUT L 142, 31.5.2008, s. 1)

Ändrad genom:

		Officiella tidningen		
		nr	sida	datum
►M1	Kommissionens förordning (EG) nr 761/2009 av den 23 juli 2009	L 220	1	24.8.2009
►M2	Kommissionens förordning (EU) nr 1152/2010 av den 8 december 2010	L 324	13	9.12.2010
►M3	Kommissionens förordning (EU) nr 640/2012 av den 6 juli 2012	L 193	1	20.7.2012
►M4	Kommissionens förordning (EU) nr 260/2014 av den 24 januari 2014	L 81	1	19.3.2014
►M5	Kommissionens förordning (EU) nr 900/2014 av den 15 juli 2014	L 247	1	21.8.2014
►M6	Kommissionens förordning (EU) 2016/266 av den 7 december 2015	L 54	1	1.3.2016
►M7	Kommissionens förordning (EU) 2017/735 av den 14 februari 2017	L 112	1	28.4.2017

▼B

KOMMISSIONENS FÖRORDNING (EG) nr 440/2008

av den 30 maj 2008

om testmetoder enligt Europaparlamentets och rådets förordning (EG) nr 1907/2006 om registrering, utvärdering, godkännande och begränsning av kemikalier (Reach)

(Text av betydelse för EES)

Artikel 1

De testmetoder som ska tillämpas för de syften som avses i förordning (EG) nr 1907/2006 fastställs i bilagan till denna förordning.

Artikel 2

Kommissionen ska där så är lämpligt se över de testmetoder som ingår i denna förordning i syfte att ersätta, minska eller förfina testning på ryggradsdjur.

Artikel 3

Hänvisningar till bilaga V till direktiv 67/548/EEG ska läsas som hänvisningar till denna förordning.

Artikel 4

Denna förordning träder i kraft dagen efter det att den har offentliggjorts i *Europeiska unionens officiella tidning*.

Den ska tillämpas från och med den 1 juni 2008.

▼B

BILAGA

▼M6

Anmärkning:

Innan någon av följande testmetoder används för att testa ett multikomponentämne, ett ämne med okänd eller varierande sammansättning, komplexa reaktionsprodukter och biologiskt material (UVCB-ämne), eller en blandning, och där metodens tillämplighet för att testa multikomponentämnen, UVCB-ämnen eller blandningar inte anges i respektive testmetod, bör det övervägas om metoden är lämplig för det avsedda regleringssyftet.

Om testmetoden används för att testa ett multikomponentämne, ett UVCB-ämne eller en blandning ska tillräcklig information om ämnets/blandningens sammansättning göras tillgänglig så långt detta är möjligt, t.ex. genom angivande av beståndsdelarnas kemiska identitet, kvantitativa förekomst och relevanta egenskaper.

▼B

DEL A: METODER FÖR BESTÄMNING AV FYSIKALISK-KEMISKA EGENSKAPER

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

A.1	SMÄLT-/FRYSPUNKT
A.2	KOKPUNKT
A.3	RELATIV DENSITET
A.4	ÅNGTRYCK
A.5	YTSPÄNNING
A.6	VATTENLÖSLIGHET
A.8	FÖRDELNINGSKOEFFICIENT
A.9	FLAMPUNKT
A.10	ANTÄNDLIGHET (FASTA ÄMNEN)
A.11	ANTÄNDLIGHET (GASER)
A.12	ANTÄNDLIGHET (KONTAKT MED VATTEN)
A.13	PYROFORISKA EGENSKAPER HOS FASTA OCH FLYTANDE ÄMNEN
A.14	EXPLOSIVA GASER
A.15	SJALVANTÄNDNINGSTEMPERATUR (VÄTSKOR OCH GASER)
A.16	RELATIV SJALVANTÄNDNINGSTEMPERATUR (FASTA ÄMNEN)
A.17	OXIDERANDE EGENSKAPER (FASTA ÄMNEN)
A.18	MOLEKYLÄR MEDEL VIKT OCH MOLEKYLÄR VIKTFÖRDELNING AV POLYMERER
A.19	INNEHÅLL AV LÅGMOLEKYLVIKTSPOLYMERER
A.20	POLYMERERS BETEENDE I VATTEN VID LÖSNING/EXTRAKTION
A.21	OXIDERANDE EGENSKAPER (VÄTSKOR)
A.22	BESTÄMNING AV FIBRERS LÄNGDVIKTADE GEOMETRISKA MEDELDIAMETER
A.23	FÖRDELNINGSKOEFFICIENT (1-OKTANOL/VATTEN): METOD MED LÅNGSAM OMRÖRNING
A.24	FÖRDELNINGSKOEFFICIENT (N-OKTANOL/VATTEN), VÄTSKEKROMATOGRAFIMETODEN (HPLC)
A.25	DISSOCIATIONSKONSTANTER I VATTEN (TITRERINGSMETOD – SPEKTROFOTOMETRISK METOD – KONDUKTOMETRISK METOD)

▼B

A.1 SMÄLT-/FRYSPUNKT

1. METOD

De flesta av de beskrivna metoderna är baserade på OECD:s riktlinjer för undersökning av kemikalier (se hänvisning 1). Grundprinciperna anges i hänvisningarna 2 och 3.

1.1 INLEDNING

De beskrivna metoderna och apparaterna kan användas för bestämning av ämnens smältpunkt, utan någon begränsning beträffande deras renhetsgrad.

Valet av metod beror på arten av det ämne som ska undersökas. Det är följaktligen avgörande om ämnet lätt, med svårighet eller inte alls kan pulvriseras.

För vissa ämnen är det mer ändamålsenligt att bestämma frys- eller stelningspunkten, och i denna metod inbegrips standarder för sådana bestämningar.

Om det till följd av ämnets särskilda egenskaper inte går att korrekt bestämma ovan nämnda parametrar kan det vara ändamålsenligt att bestämma den lägsta flytpunkten.

1.2 DEFINITIONER OCH ENHETER

Smältpunkten definieras som den temperatur vid vilken fasövergången från fast till flytande tillstånd sker vid normalt atmosfäriskt tryck, och denna temperatur motsvarar idealt fryspunkten.

Eftersom fasövergången för många ämnen sker under ett punktintervall beskrivs den ofta som smäkintervallet.

Omvandling av enheter (K till ^{o}C):

$t = T - 273{,}15$

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

T: termodynamiska temperaturen Kelvin (K)

1.3 REFERENSÄMNEN

Man behöver inte använda referensämnen varje gång ett nytt ämne ska undersökas. Referensämnen ska först och främst användas för att då och då kontrollera metoden och för jämförelse med resultat som uppnåtts med andra metoder.

Vissa referensämnen anges i hänvisningarna (se hänvisning 4).

▼B

1.4 TESTMETODSPRINCIP

Temperaturen (temperarurintervallet) för fasövergången från fast till flytande tillstånd eller från flytande till fast tillstånd bestäms. I praktiken bestäms temperaturen vid begynnande smältning/frysning och vid slutlig smältning/frysning under uppvärmning/avkylning av ett prov av testämnet vid atmosfäriskt tryck. Fem typer av metoder beskrivs, nämligen kapillärmetoder, varmebordsmetoder, fryspunktsbestämning, metoder för termisk analys och bestämning av lägsta flytpunkt (utvecklad för petroleumoljor).

I vissa fall kan det vara praktiskt att mäta fryspunkten i stället för smältpunkten.

1.4.1 **Kapillärmetoder**

1.4.1.1 *Smältpunktsanordningar med vätskebad*

Ett kapillärrör fylls med en liten, tätt packad mängd av det finmalda ämnet. Röret uppvärms tillsammans med en termometer och temperaturstegringen ställs in till mindre än ca 1 K/min under själva smältningen. Temperaturen vid begynnande och slutlig smältning bestäms.

1.4.1.2 *Srnältpunktsanordningar med metallblock*

Enligt beskrivningen under 1.4.1.1, bortsett från att kapillärröret och termometern är placerade i ett uppvärmt metallblock och kan iakttas genom hål i blocket.

1.4.1.3 *Bestämmng med fotocell*

Provet i kapillärröret uppvärms automatiskt i en metallcylinder. En ljusstråle riktas genom ämnet via ett hål i cylindern på en exakt inställd fotocell. Vid smältningen ändras de flesta ämnens optiska egenskaper från ogenomskinligt till genomskinligt. Ljusstyrkan som når fotocellen ökar, varvid en stoppsignal sänds till en digital indikator som visar temperaturen hos en platinamotståndstermometer som är placerad i värmekammaren. Denna metod kan inte användas för vissa starkt färgade ämnen.

1.4.2 **Värmebord**

1.4.2.1 *Koflers värmebänk*

Koflers värmebänk består av två elektriskt uppvärmda metallstycken med olika värmeledningsförmåga och är så utformad att dess temperaturgradient i längdriktningen nästan är linjär. Värmebänkens temperaturområde kan spänna från 283 K till 543 K och är försedd med en särskild anordning för temperaturavläsning som består av en löpare med visare och en flagga, och som är särskilt utformad för den aktuella bänken. Smältpunkten bestäms genom att det aktuella ämnet läggs i ett tunt lager direkt på värmebänkens ovansida. Efter några sekunder utvecklas en skarp skiljelinje mellan den flytande och den fasta fasen. Skiljelinjens temperatur avläses genom att visaren ställs in på linjen.

▼B

1.4.2.2 *Smältmikroskop*

Flera värmebord med mikroskop används vid bestämning av smältpunkten på mycket små provmängder. I de flesta värmeborden mäts temperaturen med ett känsligt termoelement, men ibland används även kvicksilvertermometrar. En typisk smältpunktsanordning, bestående av värmebord med mikroskop, är utrustad med en värmekammare som innehåller en metallplatta på vilken proven placeras på ett objektglas. I mitten av metallplattan finns ett hål genom vilket ljus kan sändas från mikroskopets belysningsspegel. När anordningen används är kammaren stängd med en glasplatta för att förhindra tillträde av luft till provet.

Uppvärmningen av provet regleras med en reostat. Om det krävs mycket exakta mätningar kan polariserat ljus användas för optiskt anisotropa ämnen.

1.4.2.3 *Meniskmetoden*

Denna metod används endast för polyamiden

Den temperatur vid vilken en silikonoljemenisk, som är innesluten mellan ett värmebord och ett täckglas som vilar på polyamidprovämnet, förskjuts iakttas visuellt.

1.4.3 **Metod för bestämning av fryspunkt**

Provet placeras i ett särskilt provrör och sätts i en apparat för bestämning av fryspunkten. Provet avkyls under försiktig och oavbruten omrörning och temperaturen mäts med passande mellanrum. När temperaturen är konstant vid flera avläsningar registreras denna temperatur (korrigerad för termometerfel) som fryspunkten.

Underkylning ska undvikas genom att man upprättar jämvikt mellan den fasta fasen och vätskefasen.

1.4.4 **Termisk analys**

1.4.4.1 *Differentiell termisk analys (DTA)*

Genom denna metod registreras temperaturskillnaden mellan ämnet och ett referensämne som en funktion av temperaturen medan ämnet och referensämnet utsätts för samma kontrollerade temperaturprogram. En fasövergång i provet som åtföljs av en entalpiändring visar sig genom en endoterm (smältning) eller exoterm (frysning) avvikelse från den registrerade baslinjen.

▼B

1.4.4.2 *Differentiell scanningkalorimetri (DSC)*

Genom denna metod registreras skillnaden i den energimängd som tillförs ett ämne och ett referensmaterial som en funktion av temperaturen medan ämnet och referensämnet utsätts för samma kontrollerade temperaturprogram. Denna skillnad motsvarar den energi som är nödvändig för att upprätthålla en temperaturskillnad på noll mellan ämnet och referensmaterialet. En fasövergång i provet ledsagad av en entalpiändring visar sig genom en endoterm (smältning) eller exoterm (frysning) avvikelse från den registrerade baslinjen.

1.4.5 **Flytpunkt**

Denna metod har utvecklats för petroleumoljor och är lämplig för oljeaktiga ämnen med låg smältpunkt.

Efter att provet först har värmts upp kyls det ned med en bestämd hastighet, och dess flytegenskaper undersöks med 3K:s mellanrum. Den lägsta temperaturen vid vilken rörelse av ämnet kan iakttas registreras som flytpunkten.

1.5 KVALITETSKRITERIER

I följande tabell anges de olika metodernas lämplighet och noggrannhet vid bestämning av smältpunkt/smältpunktsintervall.

TABELL: METODERNAS LÄMPLIGHET

A. **Kapillärmetoder**

Mätmetod	Ämnen som kan pulvriseras	Ämnen som inte lätt pulvriseras	Temperatur område	Uppskattad exakthet (1)	Befintlig standard
Smältpunktsanordning med vätskebad	ja	några få	273 till 573 K	± 0,3 K	JIS K 0064
Smältpunkts-anordning med metallblock	ja	några få	293 till >573K	± 0,5 K	ISO 1218 (E)
Bestämning med fotocell	ja	flera med hjälp av särskild utrustning	253 till 573 K	± 0,5 K	

(1) Beroende på typ av instrument och ämnets renhetsgrad.

▼B

B. **Värmebord och frysmetoder**

Mätmetod	Ämnen som kan pulvriseras	Ämnen som inte latt pulvriseras	Temperaturområde	Uppskattad exakthet (1)	Befintlig standard
Koflers värmebank	ja	nej	283 till > 573 K	± 1,0 K	ANSI/ASTM D 3451-76
Smältmikroskop	ja	några få-	273 till > 573 K	± 0,5 K	DIN 53736
Meniskmetod	nej	endast för polyamider	293 till > 573 K	± 0,5 K	ISO 1218 (E)
Fryspunkt-metoder	ja	ja	223 till 573 K	± 0,5 K	t.ex. BS 4695

(1) Beroende på typ av instrument och ämnets renhetsgrad.

C. **Termisk analys**

Mätmetod	Ämnen som kan pulvriseras	Ämnen som inte lätt pulvriseras	Temperaturområde	Uppskattad cxakthet (1)	Befintlig standard
Differentiell termisk analys	ja	nej	173 till 1 273 K	upp till 600 K ± 0,5 K upp till 1 273 K ± 2,0 K	ASTM E 537-76
Differentiell kalorimetri	ja	ja	173 till 1 273 K	upp till 600 K ± 0,5 K upp till 1 273 K ±2,0 K	ASTM E 537-76

(1) Beroende på typ av instrument och ämnets renhetsgrad.

D. **Flytpunkt**

Matmetod	Ämnen som kan pulvriseras	Ämnen som inte lätt pulvriseras	Temperaturområde	Uppskattad exakthet (1)	Befintlig standard
Flytpunkt	för petroleumoljor och oljeaktiga ämnen	för petroleumoljor och oljeaktiga ämnen	223 till 323 K	± 3,0 K	ASTM D 97-66

(1) Beroende på typ av instrument och ämnets renhetsgrad.

1.6 METODBESKRIVNING

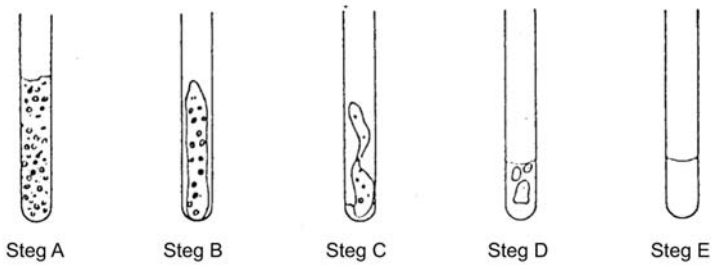
Tillvägagångssättet för nästan alla testmetoderna beskrivs i internationella och nationella standarder (se tillägg 1).

1.6.1 **Kapillärrörsmetoder**

Fint pulvriserade ämnen uppvisar vid långsam uppvärmning vanligtvis ett smältningsförlopp enligt figur 1.

▼B

Figur 1



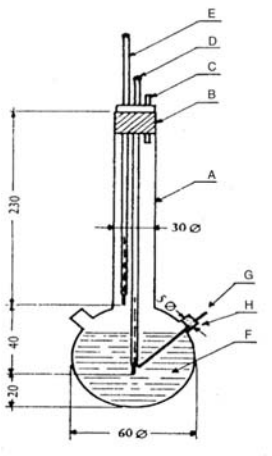
Steg A	(Begynnande smältning): Små droppar fördelar sig jämnt över kapillärrörets innervägg.
Steg B	Ett mellanrum uppstår mellan provet och innerväggen till följd av att provet krymper under smältningen.
Steg C	Det krympta provet börja sjunka mot botten och övergår i flytande form.
Steg D	En obruten menisk bildas vid ytan, men en väsentlig del av provet består fortfarande av fast ämne.
Steg E	(Slutlig smältning): Det finns inga fasta partiklar.

Vid bestämning av smältpunkten antecknas temperaturerna vid begynnande och slutlig smältning.

1.6.1.1 *Smältpunktsanordningar med vätskebad*

Figur 2 visar ett exempel på en standardiserad smältpunktsapparat (JIS K 0064) av glas. Alla mått är angivna i mm.

Figur 2



A: Mätkärl
B: Propp
C: Luftningshål
D: Termometer
E: Hjälptermometer
F: Badvätska
G: Kapillärrör av glas, längd 80 – 100 mm. in-nerdiameter 1.0 ± 0.2 mm, väggtjocklek 0.2 – 0.3 mm.
H: Sidorör

▼B

Badvätska:

En lämplig vätska väljs. Valet beror på den smältpunkt som ska bestämmas, t.ex. paraffinolja för smältpunkter upp till 473 K och silikonolja för smältpunkter upp till 573 K.

För smältpunkter över 523 K kan en blandning bestående av 3 delar svavelsyra och 2 delar kaliumsulfat (viktförhållande) användas. Vid användning av denna blandning ska lämpliga försiktighetsåtgärder vidtas.

Termometer:

Endast termometrar som uppfyller kraven i följande eller likvärdiga standarder bör användas:

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

Förfarande:

Det torra ämnet pulvriseras fint i en mortel och fylls i kapillärröret, som är tillslutet i den ena änden, till en höjd av ungefär 3 mm efter tät packning. För att få ett jämnt packat prov låter man kapillärröret falla från en höjd av ungefär 700 mm genom ett lodrätt glasrör ned på ett urglas.

Det fyllda kapillärröret placeras i badet så att den mittersta delen av termometerns kvicksilverkula berör den del av kapillärröret där provet finns. Normalt placeras kapillärröret i apparaten när badets temperatur är ungefär 10 K under smältpunkten.

Badvätskan uppvärms med en temperaturstegring av ungefar 3 K/min under omrörning av vätskan. När temperaturen är ungefär 10 K under den förväntade smältpunkten ställs temperaturstegringen in till högst 1 K/min.

Beräkning:

Smältpunkten beräknas enligt följande:

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

där:

T = korrigerad smältpunkt i K

T_D = temperaturavläsning av termometer D i K

T_E = temperaturavläsning av termometer E i K

n = antal gradindelningar av den utstående delen av termometer D:s kvicksilverpelare.

1.6.1.2 *Smältpunktsanordning med metallblock*

Apparatur:

Denna består av

— ett cylindriskt metallblock, vars översta del är ihålig och bildar en kammare (se figur 3),

— en metallpropp med två eller flera hål som gör det möjligt att föra in rör i metallblocket,

▼B

— ett uppvärmningssystem för metallblocket, t.ex. i form av ett elektriskt motstånd inneslutet i blocket,

— en reostat för reglering av energitillförseln, om elektrisk uppvärmning används,

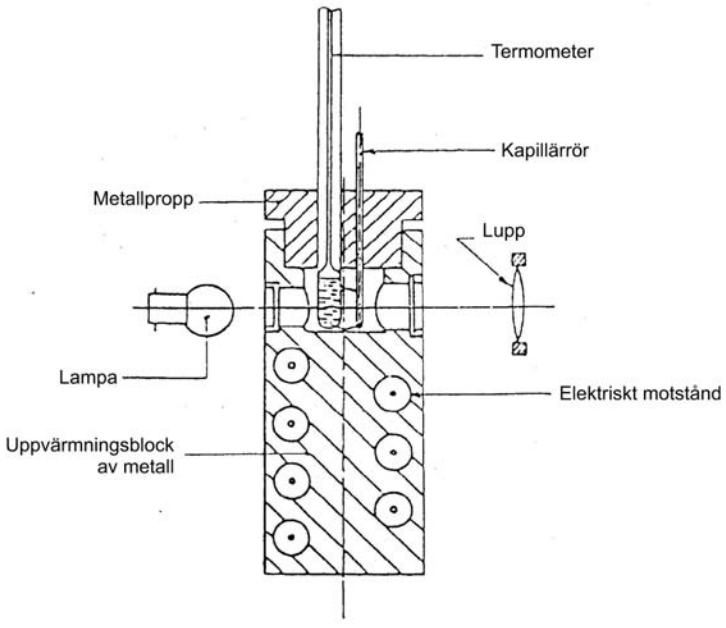
— fyra fönster av värmebeständigt glas på kammarens sidovägg, placerade diametralt och vinkelrätt mot varandra. Framför ett av dessa fönster finns en lupp monterad för iakttagelse av kapillärröret. De tre andra fönstren används för att belysa kammarens insida med hjälp av lampor,

— ett kapillärrör av värmebeständigt glas, tillslutet i ena änden (se 1.6.1.1).

Termometer:

Se standarderna i punkt 1.6.1.1. Även termoelektriska instrument med jämförbar noggrannhet kan användas.

Figur 3



1.6.1.3 *Bestämning med fotocell*

Apparatur och förfarande:

Apparaturen består av en metallkammare med ett automatiskt uppvärmningssystem. Tre kapillärrör fylls enligt 1.6.1.1 och placeras i ugnen.

▼B

Flera linjära temperaturstegringar kan användas för att kalibrera apparaturen och lämplig temperaturstegring justeras elektriskt med en förvald konstant och linjär hastighet. Skrivare visar den faktiska ugnstemperaturen och temperaturen för ämnet i kapillärrören.

1.6.2 **Värmebord**

1.6.2.1 *Koflers värmebänk*

Se tillägg.

1.6.2.2 *Smältmikroskop*

Se tillägg.

1.6.2.3 *Meniskmetoden (polyamider)*

Se tillägg.

Uppvärmningshastigheten vid smältpunkten ska vara lägre än 1 K/min.

1.6.3 **Metoder för bestämning av fryspunkt**

Se tillägg.

1.6.4 **Termisk analys**

1.6.4.1 *Differentiell termisk analys*

Se tillägg.

1.6.4.2 *Differentiell scanningkalorimetri*

Se tillägg.

1.6.5 **Bestämning av flytpunkt**

Se tillägg.

2. **DATA**

I vissa fall är termometerkorrektion nödvändigt.

3. **RAPPORTERING**

Testrapporten ska, om möjligt, innehålla följande uppgifter:

— Använd testmetod.

— Noggrann beskrivning av substansen (beteckning och orenheter) och eventuella inledande reningsåtgärder.

— Den uppskattade noggrannheten.

Som smältpunkt anges medelvärdet av minst två mätningar, som ligger inom gränserna för den uppskattade noggrannheten (se tabellerna).

▼B

Om skillnaden mellan temperaturen vid begynnande och slutlig smältning ligger inom gränsvardena för metodens noggrannhet, anges temperaturen vid den slutliga smältningen som smältpunkten. I motsatt fall anges båda temperaturerna.

Om ämnet upplöses eller sublimeras innan smältpunkten nås anges den temperatur där detta fenomen iakttas.

Alla uppgifter och upplysningar av betydelse för tolkningen av resultaten måste anges, i synnerhet vad gäller orenheter och ämnets fysiska tillstånd.

4. **HÄNVISNINGAR**

1. OECD, Paris, ”Test Guideline 102”, rådets beslut K(81) 30 slutligt, 1981.

2. IUPAC, B. Le Neindre, B. Vodar, eds, ”Experimental thermodynamics”, Butterworths, London1975, vol. II, 803–834.

3. R. Weissberg ed., ”Technique of organic Chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry”, 3rd ed., Interscience Publ., New York, 1959,, vol. I del I kapitel VII.

4. IUPAC, ”Physiochemical measurements: Catalogue of reference materials from national laboratories, Pure and applied chemistry”, vol. 48, 1976, 505–515.

▼B

Tillägg

Kompletterande tekniska upplysningar finns i följande standarder:

1. **Kapillärmetoder**

1.1 Smältpunktsanordningar med vätskebad

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 determination of melting point and/or melting range
DIN 53181	Bestimmung des Schmelzintervalles von Harzen nach Kapillarverfahren
JIS K 00-64	Testing methods for melting point of chemical products

1.2 Smältpunktsanordningar med metallblock

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

2. **Värmebord**

2.1 Koflers värmebänk

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

2.2 Smältmikroskop

DIN 53736	Visuelle Bestimmung der Schmelztemperatur von teilkristallinen Kunststoffen

2.3 Meniskmetoden (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	Résines de polyamides. Determination du ”point de fusion” Methode du ménisque

3. **Metoder för bestämning av fryspunkt**

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 pétrole: détermination de la température de figeage
DIN 53175	Bestimmung des Erstarrungspunktes von Fettsäuren
NF T 60-114	Point de fusion des paraffines
NF T 20-051	Méthode de détermination du point de cristallisation (point de congélation)
ISO 1392	Method for the determination of the freezing point

4. **Termisk analys**

4.1 Differentiell termisk analys

ASTM E 537-76	Standard method for asseying 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	Thermisches Analyse, Begriffe
4.2	Differentiell scanningkalorimetri	
	ASTM E 537-76	Standard method for asseying 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	Thermisches Analyse, Begriffe
5.	**Bestämning av flytpunkt**	
	NBN 52014	Echantillonnage et analyse des produits du pétrole: Point de trouble et point d'écoulement 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 KOKPUNKT

1. METOD

De flesta av de beskrivna metoderna är baserade på OECD:s riktlinjer för undersökning av kemikalier (se hänvisning 1). Grundprinciperna anges i hänvisningarna 2 och 3.

1.1. INLEDNING

De metoder och anordningar som beskrivs här kan användas för alla vätskor och ämnen med låg smältpunkt, förutsatt att det inte inträffar någon kemisk reaktion under kokpunkten (t.ex. autooxidation, omordning, nedbrytning). Metoderna kan användas för alla vätskor, oavsett renhetsgrad.

De metoder där man använder bestämning med fotocell och de som är baserade på termisk analys framhävs särskilt eftersom de kan användas för bestämning av både smält- och kokpunkter. Dessutom kan dessa mätningar utföras automatiskt.

Den ”dynamiska metoden” har den fördelen att den också kan användas för bestämning av ångtryck, och det är inte nödvändigt att korrigera kokpunkten till standardtryck (101,325 kPa) eftersom standardtrycket kan ställas in med en manostat under mätningen.

Anmärkningar:

Orenheters inflytande på kokpunktsbestämningen beror i hög grad på arten av orenhet. Om provet innehåller flyktiga orenheter, som kan påverka resultaten, kan ämnet eventuellt lenas.

1.2. DEFINITIONER OCH ENHETER

Standardkokpunkten definieras som den temperatur vid vilken en vätskas ångtryck är 101,325 kPa.

Om kokpunkten inte mäts vid normalt atmosfäriskt tryck kan ångtryckets beroende av temperaturen beskrivas genom Clausius-Clapeyrons ekvation:

$$\log p = \frac{\Delta H_v}{2{,}3\ RT} + konst.$$

där:

p = ämnets ångtryck i pascal

ΔH_v = ämnets förångningsvärme i J mol^{-1}

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

T = termodynamisk temperatur i K

Kokpunkten anges i förhållande till det aktuella trycket under mätningen.

▼B

Omvandling

Tryck (enhet: kPa)

100 kPa = bar = 0,1 MPa

(enheten ”bar” är fortfarande tillåten men rekommenderas inte).

133 Pa = 1 mm Hg = 1 Torr

(enheterna ”mm Hg” och ”Torr” är inte tillåtna).

1 atm = standardatmosfär = 101 325 Pa

(enheten ”atm” är inte tillåten).

Temperatur (enhet: K)

$t = T - 273{,}15$

t: temperatur i grader Celsius (^{o}C)

T: termodynamisk temperatur i kelvin (K)

1.3 REFERENSÄMNEN

Man behöver inte använda referensämnen varje gång ett nytt ämne ska undersökas. Referensämnen ska först och främst användas för att då och då kontrollera metoden och för jämförelse med resultat som uppnåtts med andra metoder.

I de metoder som anges i tillägget anges vissa referensämnen.

1.4 TESTMETODSPRINCIP

Det finns fem metoder för bestämning av kokpunkten (kokpunktsintervallet) som är baserade på mätning av den temperatur vid vilken proven kokar, och två metoder som är baserade på termisk analys.

1.4.1 **Bestämning med hjälp av ebulliometer**

Ebulliometern utvecklades ursprungligen för molekylviktsbestämning via kokpunktshöjningar, men de lämpar sig även för exakt bestämning av kokpunkter. En mycket enkel apparat beskrivs i ASTM D 1120-72 (se tillägg). I denna apparat uppvärms vätskan under jämviktsbetingelser i atmosfäriskt tryck tills den kokar.

1.4.2 **Dynamisk metod**

Genom denna metod mäts ångans förtätningstemperatur med hjälp av en lämplig termometer i återloppet vid kokning. Med denna metod kan trycket varieras.

1.4.3 **Destillationsmetod för bestämning av kokpunkt**

Genom denna metod destilleras vätskan, och ångans förtätningstemperatur och destillatmängden mäts.

▼B

1.4.4 **Siwoloboffs metod**

Ett prov uppvärms i ett provrör som är nedsänkt i vätska i ett värmebad. Ett sammangjutet kapillärrör med en luftbubbla i den nedre änden sänks ned i provröret.

1.4.5 **Bestämning med fotocell**

Vid användning av Siwoloboffs princip sker automatisk fotoelektrisk mätning av uppstigande bubblor.

1.4.6 **Differentiell termisk analys**

Genom denna metod registrerar temperaturskillnaden mellan ämnet och ett referensämne som en funktion av temperaturen medan ämnet och referensämnet utsätts för samma kontrollerade temperaturprogram. En fasöver-gång i provet som åtföljs av en entalpiändring visar sig genom en endoterm (smältning) eller exoterm (frysning) avvikelse från den registrerade baslinjen.

1.4.7 **Differentiell scanningkalorimetri**

Genom denna metod registreras skillnaden i den energimängd som tillförs ett ämne och ett referensmaterial som en funktion av temperaturen medan ämnet och referensämnet utsätts för samma kontrollerade temperaturprogram. Denna skillnad motsvarar den energi som är nödvändig för att upprätthålla en temperaturskillnad på noll mellan ämnet och referensmaterialet. En fasövergång i provet som åtföljs av en entalpiändring visar sig genom en endoterm (smältning) eller exoterm (frysning) avvikelse från den registrerade baslinjen.

1.5 KVALITETSKRITERIER

I tabell 1 anges de olika metodernas lämplighet och noggrannhet vid bestämning av kokpunkt/kokpunktsintervall.

Tabell 1

Jämförelse av metoderna

Mätmetod	Uppskattad noggrannhet	Befintliga standarder
Ebulliometer	± 1,4 K (upp till 373 K) (1) (2) ± 2,5 K (upp till 600 K) (1) (2)	ASTM D 1120-72 (1)
Dynamisk metod	± 0,5 K (upp till 600 K) (2)	
Destillationsprocess (kokpunktsintervall)	± 0,5 K (upp till 600 K)	ISO/R 918, DIN 53171, BS 4591/71
Siwoloboffs metod	± 2 K (upp till 600 K) (2)	
Bestämning med fotocell	± 0,3 K (vid 373 K) (2)	
Differentiell termisk kalorimetri	± 0,5 K (upp till 600 K) ± 2,0 K (upp till 1 273 K)	ASTM E 537-76
Differentiell scanningkalorimetn	± 0,5 K (upp till 600 K) ± 2,0 K (upp till 1 273 K)	ASTM E 537-76

(1) Denna noggrannhet gäller endast för den enkla anordning som beskrivs i t.ex. ASTM D 1120-72; den kan förbättras med mer avancerade ebulliometeranordningar.
(2) Gäller endast för rena ämnen. Användning under andra omständigheter ska motiveras.

▼B

1.6 METODBESKRIVNING

Tillvägagångssättet för vissa metoder beskrivs i internationella och nationella standarder (se tillägg).

1.6.1 **Ebulliometer**

Se tillägg.

1.6.2 **Dynamisk metod**

Se testmetod A.4 för bestämning av ångtrycket.

Den kokpunkt, som iakttas vid ett tryck av 101,325 kPa, antecknas.

1.6.3 **Destillationsförlopp (kokpunktsintervall)**

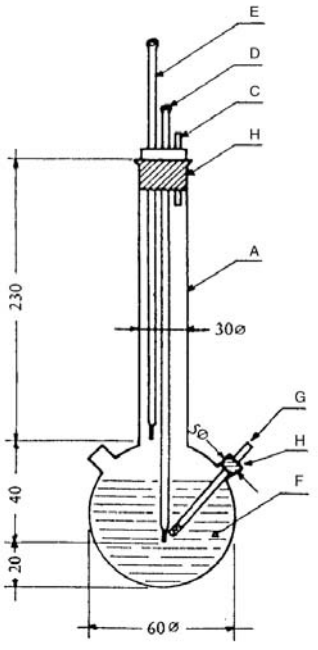
Se tillägg.

1.6.4 **Siwoloboffs metod**

Provet uppvärms i en smältpunktsapparat i ett provrör med en diameter på ungefär 5 mm (se figur 1).

Figur 1 visar en typ av en standardiserad smält- och kokpunktsapparat (JIS K 0064) (gjord av glas, alla mått i mm).

Figur 1



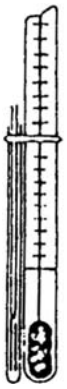
A: Mätkärl
B: Propp
C: Luftningshål
D: Termometer
E: Hjälptermometer
F: Badvätska
G: Provrör, högst 5 mm ytterdiameter, med ett ca 100 mm långt kapillärrör med en innerdiameter av ca 1 mm och en väggtjocklek av ca 0,2 - 0,3 mm.
H: Sidorör

Ett kapillärrör, som är tillslutet ungefär 1 cm ovanför den nedre änden, placeras i provröret. Provet fylls så högt upp att den tillslutna delen av kapillärröret befinner sig under vattenytan. Provröret med kapillärröret fästs vid termometern med ett gummiband eller med ett stöd från sidan (se figur 2).

▼B

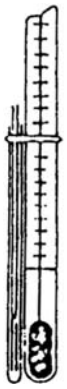
Figur 2

Siwoloboffs princip



Figur 3

Modifierad princip



Badvätskan väljs med hänsyn till kokpunkten. Vid temperaturer upp till 573 K kan silikonolja användas. Paraf-finolja kan endast användas upp till 473 K. Uppvärmningen av badvätskan ska i början regleras till en temperaturstegring av 3 K/min, under omrörning. Vid ungefär 10 K under den förväntade kokpunkten sänks värmetillförseln så att temperaturstegringen blir mindre än 1 K/min. När temperaturen närmar sig kokpunkten börjar bubblor strömma ut från kapillärröret.

Kokpunkten är den temperatur då bubbelströmmen under en kortvarig temperaturminskning upphör och vätskan börjar stiga upp i kapillärröret. Termometeravläsningen visar ämnets kokpunkt.

I den modifierade principen (se figur 3) bestäms kokpunkten i ett kapillärrör avsett för smältpunktsbestämning. Det sträcks till en finspetsig tråd, ungefär 2 cm lång (a), och en liten provmängd sugs upp. Den öppna änden av det fina kapillärröret tillsluts genom smältning på så vis att en liten luftbubbla blir kvar i änden. Vid uppvärmning i smältpunktsapparaten (b) utvidgar sig luftbubblan. Kokpunkten är den temperatur vid vilken ämnesproppen når upp till ytan av badvätskan.

1.6.5 **Bestämning med fotocell**

Provet uppvärms i ett kapillärrör i ett uppvärmt metallblock.

En ljusstråle riktas via lämpliga hål i blocket genom ämnet mot en exakt inställd fotocell.

Medan provets temperatur stiger utvecklas enstaka luftbubblor från kapillärröret. När kokpunkten är nådd ökar antalet bubblor kraftigt. Detta leder till att styrkan ändras på det ljus som är riktat mot fotocellen och en stoppsignal sänds till en indikator som visar temperaturen på en motståndstermometer av platina som är placerad i blocket.

Denna metod är särskilt användbar eftersom den kan användas för bestämningar under rumstemperatur ned till 253,15 K (- 20 °C) utan ändringar av apparaturen. Instrumentet ska endast placeras i ett kylbad.

▼B

1.6.6 **Termisk analys**

1.6.6.1 *Differentiell termisk analys*

Se tillägg.

1.6.6.2 *Differentiell scanningkalorimetri*

Se tillägg.

2. **DATA**

Vid små avvikelser från normalt tryck (högst ± 5 kPa) korrigeras kokpunktstemperaturer till Tn med användning av följande Sidney Young ekvation:

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

där:

$\Delta p = (101{,}325 - p)$ [observera förtecknet]

P = ptrycket mätt i kPa

f_T = kokpunktens ändring med trycket i K/kPa

T = uppmätt kokpunkt i K

T_n = kokpunkt korrigerad till normalt tryck i K

I ovannämnda internationella och nationella standarder finns temperaturkorrektionsfaktorer f_T för ett flertal ämnen och ekvationer för approximation av dem.

Exempelvis anges i DIN 53171 följande grova korrektioner för lösningsmedel som ingår i färger:

Tabell 2:

Temperaturkorrektionsfaktorer f_t

Temperatur T (K)	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**

Testrapporten ska, om möjligt, innehålla följande uppgifter:

— Använd testmetod.

— Noggrann beskrivning av substansen (beteckning och orenheter) och eventuella inledande reningsåtgärder.

— Den uppskattade noggrannheten.

Som kokpunkt anges medelvärdet av minst två mätningar, som ligger mom gränserna för den uppskattade noggrannheten (se tabell 1).

De uppmätta kokpunkterna och medelvärdet av dessa ska anges, och det tryck vid vilket mätningarna gjordes ska anges i kPa. Trycket bör helst ligga i närheten av normalt atmosfäriskt tryck.

Alla uppgifter och upplysningar av betydelse för tolkningen av resultaten ska anges, i synnerhet vad gäller orenheter och ämnets fysiska tillstånd.

4. **HÄNVISNINGAR**

1. OECD, Paris, 1981, Test Guideline 103, rådets beslut K(81) 30 slutligt.

2. IUPAC, B. Le Neindre, B. Vodar, eds. Experimental thermodynamics, Butterworths, London 1975, vol. II.

3. R. Weissberg ed.: Technique of organic Chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed., Inter-science Publ., New York, 1959, vol. I, del I, kapitel VII.

▼B

Tillägg

Kompletterande tekniska uppgifter finns, i följande standarder:

1. **Ebulliometer**

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

2. **Destillationsprocess (kokpunktsintervall)**

ISO/R 918	Test Method for Distillation (Distillation Field 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	Lösungsmittel fur Anstrichstoffe, Bestimmung des Siederverlaufes
NF T 20-608	Distillation: determination du rendement et de l'intervalle de distillation

3. **Differentiell termisk analys och differentiell scanningkalorimetri**

ASTM E 537-76	Standard method for assessine the thermal stability of chemicals by methods or 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	Thermisches Analyse, Begriffe

▼B

A.3 RELATIV DENSITET

1. METOD

De flesta av de beskrivna metoderna är baserade på OECD:s riktlinjer för undersökning av kemikalier (se hänvisning 1). Grundprinciperna anges i hänvisning 2.

1.1 INLEDNING

De beskrivna metoderna för bestämning av relativ densitet kan användas för fasta ämnen och vätskor, oavsett renhetsgrad. De olika metoder som får användas anges i tabell 1.

1.2 DEFINITIONER OCH ENHETER

Fasta ämnens och vätskors relativa densitet (D_4^{20}) är förhållandet mellan det undersökta ämnets vikt per volymenhet, bestämd vid 20 °C och vikten per samma volymenhet vatten, bestämd vid 4 °C. Den relativa densiteten har ingen dimension.

Ett ämnes densitet, Q, är kvoten av vikten, m, och dess volym, v.

Densiteten, Q, anges, i SI-enheter, i kg/m^3.

1.3 REFERENSÄMNEN (SE HÄNVISNING 1 OCH 3)

Referensämnen behöver inte användas varje gång ett nytt ämne ska undersökas. De ska först och främst användas för att då och då kontrollera metoden och för jämförelse med resultat som uppnåtts med andra metoder.

1.4 TESTMETODSPRINCIP

Fyra metoder används.

1.4.1 **Flottörmetoder**

1.4.1.1 *Hydrometer (för vätskor)*

Tillräckligt noggranna och snabba densitetsbestämningar kan göras med flytande hydrometrar, med vilka en vätskas densitet kan härledas från nedsänkningsgraden som avläses på en skala.

1.4.1.2 *Hydrostatisk balans (för vätskor och fasta ämnen)*

Skillnaden mellan provets vikt mätt i luft och i en lämplig vätska (t.ex. vatten) kan användas för att bestämma dess densitet.

För fasta ämnen är den mätta densiteten endast representativ för just det prov som har använts vid bestämningen. När densiteten hos vätskor ska bestämmas vägs först en kropp med känd volym, v, i luft och sedan i vätskan.

1.4.1.3 *Metod med nedsänkt kula (för vätskor) (se hänvisning 4)*

Med denna metod bestäms en vätskas densitet utifrån skillnaden mellan vätskans vikt före och efter nedsänkning av en kula med känd volym i testvätskan.

▼B

1.4.2 **Pyknometermetoder**

Pyknometrar av olika utformning och med kända volymer kan användas till fasta ämnen och vätskor. Densiteten beräknas utifrån viktskillnaden mellan den fulla och den tomma pyknometern och dess kända volym.

1.4.3 **Luftjämförelsepyknometer (för fasta ämnen)**

Densiteten hos ett fast ämne, oavsett form, kan bestämmas vid rumstemperatur med en gasjämförelsepyknometer. Ämnets volym mäts i luft eller en inert gas i en cylinder med varierbar kalibrerad volym. Densiteten beräknas genom att vikten mäts efter volymbestämningen.

1.4.4 **Oscillerande densitometer (se hänvisning 5, 6 och 7)**

En vätskas densitet kan bestämmas med en oscillerande densitometer. En mekanisk oscillator i form av ett U-rör sätts i vibration vid en viss frekvens som är beroende på oscillatorns vikt. När ett prov införs ändras oscillatorns resonansfrekvens. Apparaturen ska kalibreras med två vätskor med känd densitet. Dessa vätskor ska helst väljas så att deras densiteter spänner över hela det område som ska mätas.

1.5 KVALITETSKRITERIER

I tabellen anges de olika metodernas lämplighet för bestämning av densitet.

1.6 METODBESKRIVNING

Tillägget innehåller en lista över några standarder, från vilka ytterligare tekniska uppgifter kan inhämtas.

Mätningarna ska utföras vid 20 °C, och minst två mätningar ska göras.

2. **DATA**

Se standarder.

3. **RAPPORTERING**

Testrapporten ska, om möjligt, innehålla följande uppgifter:

— Använd testmetod.

— Exakt specificering av ämnet (beteckning och orenheter) och eventuella inledande reningsåtgärder.

Den relativa densiteten D_4^{20} ska anges enligt definitionen i 1.2 tillsammans med det undersökta ämnets fysiska tillstånd.

Alla uppgifter och anmärkningar av betydelse för tolkningen av resultaten ska rapporteras, i synnerhet vad gäller orenheter och ämnets fysiska tillstånd.

▼B

Tabell

Metodernas lämplighet

Mätmetod	Densitet		Maximal dynamisk viskositet	Befintliga standarder
	Fasta	Vätskor		
1.4.1.1. Hydrometer		ja	5 Pa s	ISO 387, ISO 649-2, NF T 20-050
1.4.1.2 Hydrostatisk balans				
a) fasta ämnen	ja			ISO 1183 (A)
b) vätskor		ja	5 Pa s	ISO 901 and 758
1.4.1.3 Metod med nedsänkt kula		ja	20 Pa s	DIN 53217
1.4.2 Pyknometer				ISO 3507
a) fasta ämnen	ja			ISO 1183(B), NF T 20-053
b) vätskor		ja	500 Pa s	ISO 758
1.4.3 Luftjämförelsepyknometer	ja			DIN 55990 Teil 3, DIN 53243
1.4.4 Oscillerande densitometer		yes	5 Pa s	

4. **HÄNVISNINGAR**

1. OECD, Paris, 1981, Test Guideline 109, rådets beslut K(81) 30 slutligt.

2. R. Weissberger ed., Technique of Organic Chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed., kapitel IV, Interscience Publ., New York, 1959, vol. I, del 1.

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

4. Wagenbreth, H., Die Tauchkugel zur Bestimmung der Dichte von Fliüssigkeiten, Technisches Messen tm, 1979, vol. 11, s. 427–430.

5. Leopold, H., Die digitale Messung von Flussigkeiten, Elektronik, 1970, vol. 19, s. 297–302.

6. Baumgarten, D., Füllmengenkontrolle bei vorgepackten Erzeugnissen – Verfahren zur Dichtebestimmung bei fliüssigen Produkten und ihre praktische Anwendung, Die Pharmazeutische Industrie, 1975, vol. 37, s. 717–726.

7. Riemann, J., Der Einsatz der digitalen Dichtemessung im Brauereilaboratorium, Brauwissenschaft, 1976, vol. 9, s. 253–255.

▼B

Tillägg

Kompletterande tekniska uppgifter finns i följande standarder:

1. **Flottörmetoder**

1.1 Hydrometer

DIN 12790, ISO 3S7	Hydrometer, general instructions
DIN 12791	Part I: Density hydrometers; construction, admjustment 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 Aerometric method
DIN 12793	Laboratory glassware: range find hydrometers

1.2 Hydrostatisk balans

För fasta ämnen

ISO 1183	Method A: Methods för 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 elastometers; determination of density

För vätskor

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 och 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 petro-leum products by hydrometer method

1.3 Metod med nedsänkt kula

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

2. **Pyknometermetoder**

2.1 För vätskor

ISO 3507	Pycnometers
ISO 758	Liquid chemical products; determination of density at 20 ^{o}C
DIN 12797	Gay-Lussac pycnometer (för icke-flyktiga vätskor som inte är för viskösa)
DIN 12798	Lipkin pycnometer (för vätskor med kinematisk viskositet under 100 × 10^{-6} m^2s^{-1} vid 15 ^{o}C)
DIN 12800	Sprengel pycnometer (för vätskor enligt DIN 12798)
DIN 12801	Reischauer pycnometer (för vätskor med kinematisk viskositet under 100 × 10^{-6} m^2s^{-1} vid 20 ^{o}C, särskilt lämplig även för kolväten och vattenlösningar samt för vätskor med högre ångtryck, cirka 1 bar vid 90 ^{o}C)

▼B

DIN 12806	Hubbard pycnometer (för alla typer av viskösa vätskor som inte har för högt ångtryck, särskilt även för färg, lacker och bitumen)
DIN 12807	Bingham pycnometer (för vätskor enligt DIN 12801)
DIN 12808	Jaulmes pycnometer (särskilt för etanol-vattenblandningar)
DIN 12809	Pycnometer with ground-in thermometer and capillary side tubes (för väts-kor som inte är för tjockflytande)
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 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 – Pykonometric method

▼B

2.2	För fasta ämnen	
	ISO 1183	Metod B i Method 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 – Pycnometric method
	DIN 19683	Determination of the density of soils
3.	**Luftjämförelsepyknometer**	
	N	Part 3: Prüfung von Anstrichstoffen und ähnlichen Beschichtungsstoffen: Pulverlack; Bestimmung der Dichte
	DIN 53243	Anstrichstoffe; Chlorhaltige Polymere; Prüfung

▼M1

A.4 ÅNGTRYCK

1. METOD

Den här metoden motsvarar OECD TG 104 (2004).

1.1 INLEDNING

Den här ändrade versionen av metod A.4 (1) omfattar ytterligare ett sätt att bestämma ångtrycket: Effusionsmetod: isoterm termogravimetri, avsedd för ämnen med mycket lågt ångtryck (ned till 10^{-10} Pa). Med tanke på behovet av metoder, i synnerhet för att bestämma ångtrycket hos ämnen med lågt ångtryck, pågår en förnyad utvärdering av andra varianter av denna metod för att se inom vilka ångtrycksintervall de kan användas.

Vid termodynamisk jämvikt beror ångtrycket hos ett rent ämne endast på temperaturen. De grundläggande principerna beskrivs i referenslitteraturen (2)(3).

Det finns inte någon mätmetod som kan användas inom hela ångtrycksintervallet, dvs. från mindre än 10^{-10} upp till 10^5 Pa. I det här dokumentet beskrivs därför åtta olika metoder för mätning av ångtrycket som kan användas inom olika ångtrycksintervall. I tabell 1 jämförs de olika metodernas tillämpnings- och mätområde. Metoderna kan endast användas för föreningar som inte sönderdelas under de rådande försöksbetingelserna. Om det av tekniska skäl inte är möjligt att använda någon av de experimentella metoderna är det också möjligt att uppskatta ångtrycket. En lämplig uppskattningsmetod beskrivs i tillägget.

1.2 DEFINITIONER OCH ENHETER

Ett ämnes ångtryck definieras som mättnadstrycket över ett fast eller flytande ämne.

SI-enheten för tryck, som är pascal (Pa), ska användas. Nedan anges andra enheter, som använts tidigare, samt deras omvandlingsfaktorer:

1 Torr	=	1 mm Hg	=	$1{,}333 \times 10^2$ Pa
1 atmosfär	=	$1{,}013 \times 10^5$ Pa		
1 bar	=	10^5 Pa		

SI-enheten för temperatur är kelvin (K). För att omvandla temperaturen i celsiusgrader till kelvin används följande formel:

$$T = t + 273{,}15$$

där T är temperaturen i kelvin (den termodynamiska temperaturen) och t är temperaturen i celsiusgrader.

▼**M1**

Tabell 1

Mätmetod	Ämnen		Uppskattad repeterbarhet	Uppskattad reproducerbarhet	Rekommenderat intervall
	Fasta	Flytande			
Dynamisk metod	Lågsmältande	Ja	upp till 25 % 1–5 %	upp till 25 % 1–5 %	10^3 Pa till 2 × 10^3 Pa 2 × 10^3 till 10^5 Pa
Statisk metod	Ja	Ja	5–10 %	5–10 %	10 Pa till 10^5 Pa 10^{-2} Pa till 10^5 Pa (1)
Isoteniskopisk metod	Ja	Ja	5–10 %	5–10 %	10^2 Pa till 10^5 Pa
Effusionsmetod: ångtrycksjämvikt	Ja	Ja	5–20 %	upp till 50 %	10^{-3} till 1 Pa
Effusionsmetod: Knudsencell	Ja	Ja	10–30 %	—	10^{-10} till 1 P
Effusionsmetod: isoterm termogravimetri	Ja	Ja	5–30 %	upp till 50 %	10^{-10} till 1 Pa
Gasmättnadsmetod	Ja	Ja	10–30 %	upp till 50 %	10^{-10} till 10^3 Pa
Rotormetod	Ja	Ja	10–20 %	—	10^{-4} till 0,5 Pa

(1) Vid användning av en kapacitansmanometer.

1.3 TESTPRINCIP

Ångtrycket bestäms vanligen vid olika temperaturer. Enligt den förenklade Clapeyron-Clausius-ekvationen är logaritmen av ångtrycket för ett rent ämne en linjär funktion av den inverterade termodynamiska temperaturen inom ett begränsat temperaturintervall.

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

där:

p = ångtrycket i pascal

ΔHv = ångbildningsvärmet i J mol^{-1}

R = den allmänna gaskonstanten, dvs. 8,314 J mol^{-1} K^{-1}

T = temperaturen i K

▼**M1**

1.4 REFERENSSUBSTANSER

Det är i regel inte nödvändigt att använda referenssubstanser. De behöver endast användas då och då för att kontrollera metodens prestanda och för att möjliggöra resultatjämförelser mellan olika metoder.

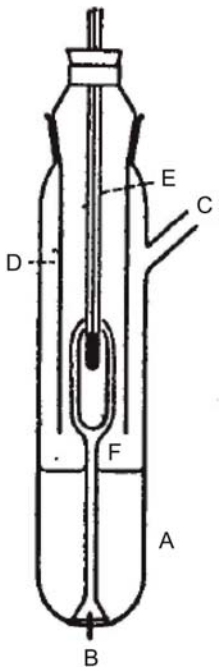
1.5 METODBESKRIVNING

1.5.1 **Dynamisk metod (Cottrells metod)**

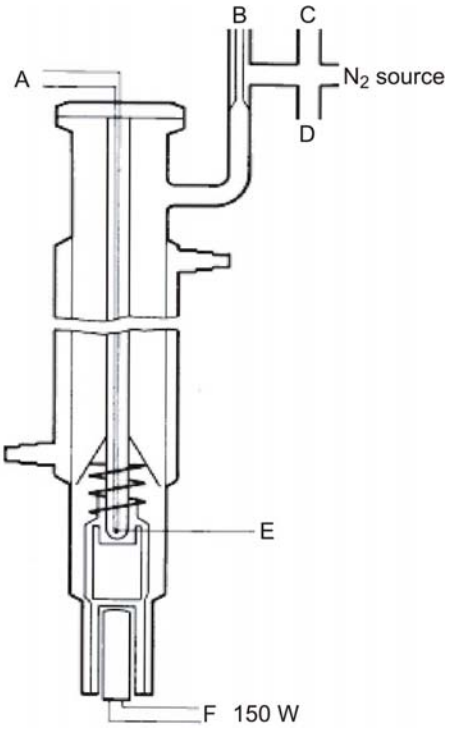
1.5.1.1 *Princip*

Ångtrycket bestäms genom att ämnets kokpunkt mäts vid flera kända tryck mellan ca 10^3 och 10^5 Pa. Den här metoden rekommenderas också för bestämning av kokpunkten. Den kan användas för kokpunkter på upp till 600 K. Beroende på vätskepelarens hydrostatiska tryck är vätskors kokpunkt omkring 0,1 °C högre på ett djup av 3–4 cm än på ytan. I Cottrells metod (4) placeras termometern i ångan över vätskeytan så att den kokande vätskan hela tiden sköljer över termometerkulan. Denna täcks då av ett tunt vätskeskikt som vid atmosfärstryck står i jämvikt med ångfasen. Termometern anger således den verkliga kokpunkten utan fel som beror på överhettning eller hydrostatiskt tryck. Den pump som ursprungligen användes av Cottrell visas i figur 1. Rör A innehåller den kokande vätskan. En platinatråd B som är fäst på rörets botten ger en jämn kokning. Sidoröret C leder till en kylare och manteln D förhindrar att det kylda kondensatet når termometern E. När vätskan i A kokar kommer bubblor och vätska som fångats upp av tratten att skölja över termometerkulan via pumpens F båda armar.

Figur 1



Figur 2



▼**M1**

Cottrellpump (4)

A: Termoelement

B: Vakuumbuffertvolym

C: Tryckmätare

D: Vakuum

E: Mätpunkt

F: Värmeelement (ca 150 W)

1.5.1.2 *Utrustning*

I figur 2 visas en mycket noggrann mätutrustning som tillämpar Cottrells princip. Den består av ett rör med en sektion som är avsedd för kokning i nedre delen, en kylare i mitten samt ett utlopp och en fläns i den övre delen. Cottrellpumpen placeras i den rörsektion som är avsedd för kokning och denna del av röret värms upp med hjälp av en elpatron. Temperaturen mäts med ett mantlat termoelement eller en resistanstermometer som förs in genom flänsen i rörets övre del. Utloppet ansluts till tryckregleringssystemet, som består av en vakuumpump, en buffertvolym, en manostat för tillförsel av kvävgas (för tryckreglering) och en manometer.

1.5.1.3 *Förfarande*

Ämnet placeras i den rörsektion som är avsedd för kokning. Det kan uppstå problem med fasta ämnen som inte är i pulverform, men detta kan ibland undvikas genom att man värmer kylmanteln. Utrustningen försluts vid flänsen och gaser drivs av. Skummande ämnens ångtryck kan inte mätas med denna metod.

Det lägsta önskade trycket ställs in och värmen slås på. Samtidigt ansluts temperaturgivaren till en skrivare.

Jämvikt har nåtts när en konstant kokpunkt registreras vid konstant tryck. Det är viktigt att undvika stötkokning. Dessutom måste ämnet kondenseras helt på kylaren. Vid bestämning av ångtrycket för lågsmältande fasta ämnen är det viktigt att se till att kylaren inte täpps till.

När jämviktspunkten har registrerats ställs ett högre tryck in. Man fortsätter på samma sätt tills ett tryck på 10^5 Pa nås (totalt omkring 5–10 mätpunkter). För att kontrollera mätvärdena måste man upprepa mätningarna vid stegvis lägre tryck.

1.5.2 **Statisk metod**

1.5.2.1 *Princip*

I den statiska metoden (5) bestäms ångtrycket vid termodynamisk jämvikt vid en viss temperatur. Den här metoden lämpar sig för ämnen och flerkomponentblandningar i flytande eller fast form med ett ångtryck från 10^{-1} till 10^5 Pa. Om man är försiktig kan den också användas i intervallet 1 till 10 Pa.

▼M1

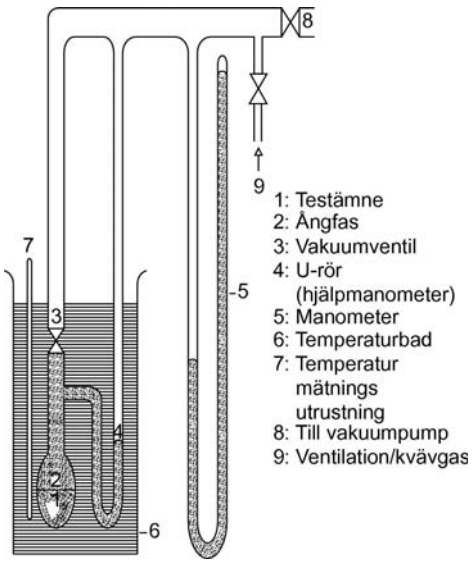
1.5.2.2 *Utrustning*

Utrustningen består av ett bad som hålls vid konstant temperatur (precision på ±0,2 K), en provbehållare ansluten till en vakuumledning, en manometer och ett tryckregleringssystem. Provkärlet (figur 3 a) ansluts till vakuumledningen via en ventil och en differentialmanometer (U-rör innehållande en lämplig manometervätska) som fungerar som nollindikator. Beroende på tryckintervallet och det testade ämnets kemiska egenskaper kan kvicksilver, silikoner eller ftalater användas i differentialmanometern. Av miljöskäl bör man emellertid om möjligt undvika att använda kvicksilver. Testsubstansen bör inte vara märkbart löslig i eller reagera med vätskan i U-röret. En tryckmätare kan användas i stället för ett U-rör (figur 3 b). Kvicksilver kan användas i manometern från normaltryck ned till 10^2 Pa, medan silikoner och ftalater lämpar sig i tryckintervallet 10 Pa till 10^2 Pa. Det finns andra tryckmätare som kan användas vid lägre tryck än 10^2 Pa, och manometrar med uppvärmningsbara membran kan till och med användas under 10^{-1} Pa. Temperaturen mäts på provbehållarens yttre vägg eller i själva kärlet.

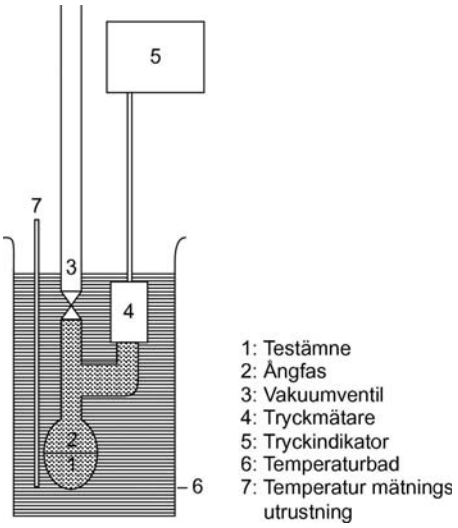
1.5.2.3 *Förfarande*

Vid användning av den utrustning som beskrivs i figur 3 a fylls U-röret med den valda vätskan och gaser drivs av vid hög temperatur innan några avläsningar görs. Testsubstansen placeras i provkärlet och gaser drivs av vid lägre temperatur. Om provet består av flera komponenter måste temperaturen vara så låg att provets sammansättning inte förändras. Jämvikt nås snabbare vid omrörning. Provet kan kylas ned med flytande kväve eller kolsyreis, men det är då viktigt att undvika att luft eller pumpvätska kondenserar. Ventilen över provkärlet öppnas och luften sugs ut under flera minuter. Om det behövs kan avdrivningen av gaser upprepas flera gånger.

Figur 3 a



Figur 3 b



▼M1

När provet värms upp med ventilen stängd ökar ångtrycket. Därmed rubbas jämvikten hos vätskan i U-röret. För att kompensera för detta tillförs kvävgas eller luft tills tryckskillnadsindikatorn åter visar noll. Det tryck som behövs för att återställa jämvikten kan avläsas på manometern eller på ett instrument med högre precision. Detta tryck motsvarar ämnets ångtryck vid den temperatur där mätningen äger rum. Vid användning av den utrustning som visas i figur 3 b kan ångtrycket avläsas direkt.

Ångtrycket bestäms med tillräckligt små temperaturintervall (totalt omkring 5–10 mätpunkter) upp till den önskade högsta temperaturen.

Avläsningar vid låga temperaturer måste upprepas för att kontrollera att samma värde erhålls. Om de värden som erhålls vid sådana upprepade avläsningar inte överensstämmer med den kurva som erhölls vid stigande temperaturer kan detta bero på att

i) provet fortfarande innehåller luft (detta kan till exempel vara fallet med mycket viskösa ämnen) eller på att lågkokande ämnen avges under uppvärmningen,

ii) ämnet undergår en kemisk reaktion i det undersökta temperaturintervallet (t.ex. sönderdelning eller polymerisering).

1.5.3 **Isoteniskopisk metod**

1.5.3.1 *Princip*

Den isoteniskopiska metoden (6) grundas på samma princip som den statiska metoden. Metoden går ut på att ett prov placeras i en kolv som hålls vid konstant temperatur och som ansluts till en manometer och en vakuumpump. Föroreningar som är mer flyktiga än provet avlägsnas genom att gaserna drivs av vid sänkt tryck. Provets ångtryck vid en viss temperatur balanseras av ett känt tryck av inert gas. Metoden utvecklades för att mäta ångtrycket hos vissa flytande kolväten, men kan även användas för att undersöka fasta ämnen. Den är i allmänhet inte lämplig för flerkomponentsystem. Resultaten är endast behäftade med små fel för prov som innehåller icke-flyktiga föroreningar. Det rekommenderade tryckintervallet är 10^2 till 10^5 Pa.

1.5.3.2 *Utrustning*

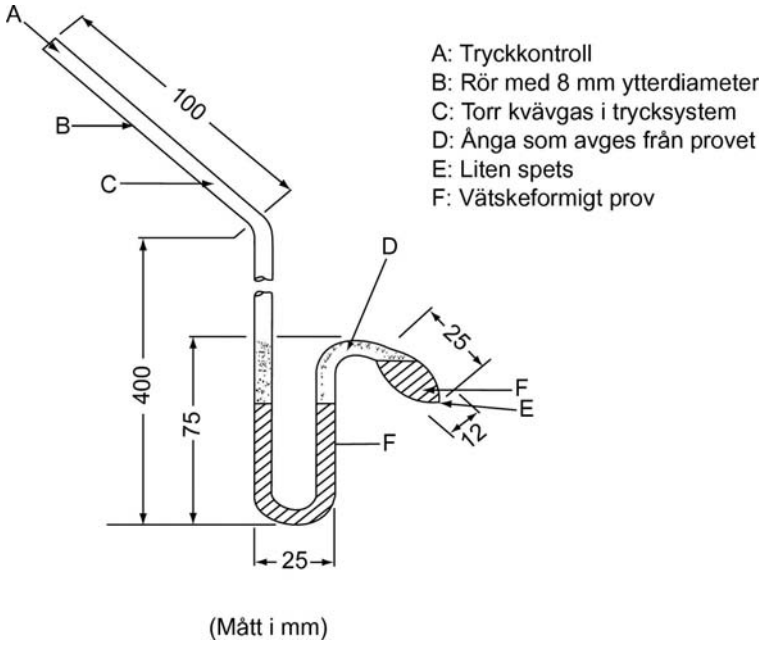
Ett exempel på mätutrustning visas i figur 4. En fullständig beskrivning återfinns i ASTM D 2879-86 (6).

▼M1

1.5.3.3 *Förfarande*

Om provet är en vätska är det själva ämnet som används som vätska i differentialmanometern. En vätskemängd som är tillräckligt stor för att fylla kolven och manometerns kortare rör tillsätts isoteniskopet. Isoteniskopet, som är anslutet till ett vakuumsystem, evakueras och fylls därefter med kvävgas. Evakueringen och genomblåsningen av systemet med kvävgas upprepas två gånger för att avlägsna kvarvarande syre. Det fyllda isoteniskopet placeras horisontellt så att provet sprids ut i ett tunt skikt i provkolven och manometern. Systemets tryck minskas till 133 Pa och provet värms försiktigt tills det precis börjar koka (avdrivning av lösta gaser). Isoteniskopet placeras därefter så att provet återgår till kolven och fyller manometerns kortare rör. Trycket bibehålls vid 133 Pa. Provkolvens utdragna spets värms med en liten låga tills den ånga som avges från provet utvidgas så mycket att en del av provet pressas ut ur kolvens övre del och manometerröret in i manometern och skapar ett ångfyllt, kvävgasfritt utrymme. Isoteniskopet placeras sedan i ett bad med konstant temperatur och kvävgastrycket justeras tills det är lika högt som provets tryck. Vid jämvikt är kvävgastrycket lika högt som ämnets ångtryck.

Figur 4



För fasta ämnen används manometervätskor som silikoner och ftalater. Valet av manometervätska beror på de aktuella tryck- och temperaturintervallen. Manometervätskan, från vilken gaser drivits av, placeras i en utbuktning på isoteniskopets längre arm. Det fasta ämne som ska undersökas placeras sedan i provkolven och gaser drivs av vid hög temperatur. Därefter lutas isoteniskopet så att manometervätskan kan flöda in i U-röret.

▼M1

1.5.4 **Effusionsmetod: ångtrycksjämvikt** (7)

1.5.4.1 *Princip*

Ett prov av det ämne som ska testas värms upp i en liten ugn och placeras i en evakuerad glaskupa. Ugnen täcks med ett lock med små hål av kända diametrar. Den ånga som avges från ämnet och som sipprar ut genom ett av hålen riktas mot vågskålen på en ytterst känslig våg som också befinner sig i den evakuerade glaskupan. I vissa försöksuppställningar omges vågskålen av en kyllåda, varifrån värme avleds till utsidan genom värmeledning, och kyls genom strålning så att den ånga som sipprar ut kondenserar på vågskålen. Ångstrålens rörelsemängd agerar som en kraft på vågen. Ångtrycket kan bestämmas på två sätt: antingen direkt från den kraft som utövas på vågskålen eller från avdunstningshastigheten enligt Hertz-Knudsens ekvation (2):

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

där:

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

M = molmassan (g mol^{-1})

T = temperaturen (K)

R = den allmänna gaskonstanten (J mol^{-1} K^{-1})

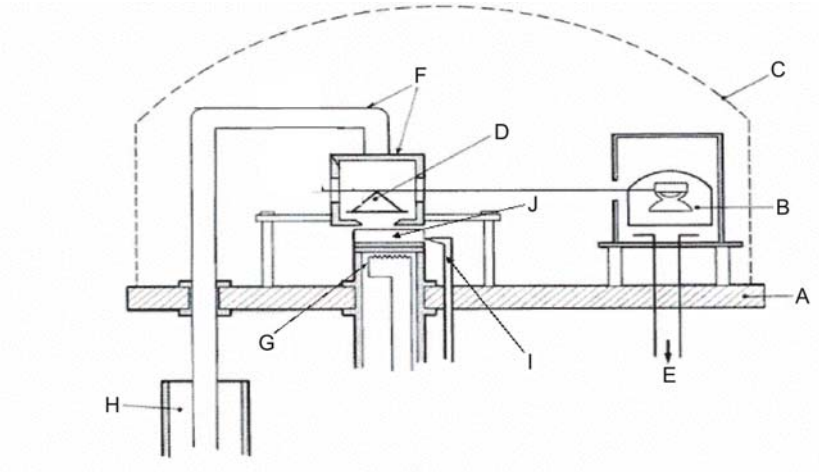
P = ångtrycket (Pa)

Det rekommenderade tryckintervallet är 10^{-3} till 1 Pa.

1.5.4.2 *Utrustning*

Den allmänna principen för utrustningen illustreras i figur 5.

Figur 5



A:	Bottenplatta	F:	Kyllåda och kylstav
B:	Vridspoleinstrument	G:	Förångningsugn
C:	Glaskupa	H:	Termos med flytande kväve
D:	Våg med vågskål	I:	Mätning av provets temperatur
E:	Vakuummätare	J:	Testsubstans

▼M1

1.5.5 **Effusionsmetod: Knudsencell**

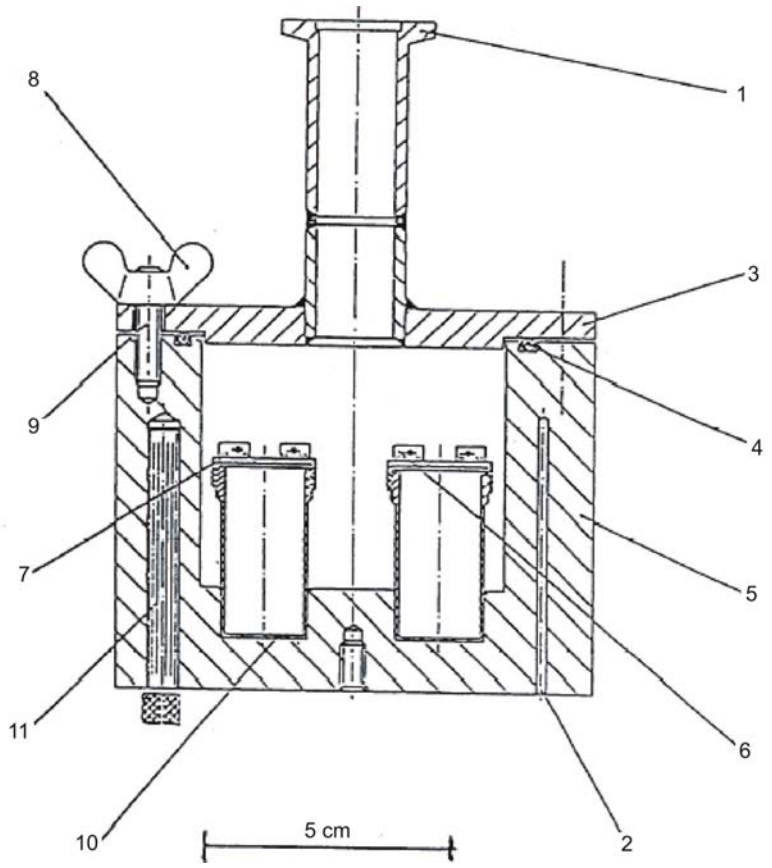
1.5.5.1 *Princip*

Metoden grundas på en uppskattning av den massa av testsubstansen som per tidsenhet strömmar ut från en Knudsencell (8) i form av ånga genom en ytterst liten mynning under ultrahögt vakuum. Den avgivna ångans massa kan erhållas antingen genom att man bestämmer cellens massförlust eller genom att ångan kondenseras vid låg temperatur, varefter mängden förångat ämne bestäms med kromatografi. Ångtrycket beräknas med hjälp av Hertz-Knudsens ekvation (se avsnitt 1.5.4.1) med korrektionsfaktorer som beror på utrustningens parametrar (9). Det rekommenderade ångtrycksintervallet är 10^{-10} till 1 Pa (10)(11)(12)(13)(14).

1.5.5.2 *Utrustning*

Den allmänna principen för utrustningen illustreras i figur 6.

Figur 6



1:	Anslutning till vakuum	7:	Skruvlock
2:	Öppningar för resistanstermometer av platina eller för mätning och kontroll av temperatur	8:	Vingmuttrar
3:	Lock till vakuumbehållare	9:	Bultar
4:	O-ring	10:	Effusionsceller av rostfritt stål
5:	Vakuumbehållare av aluminium	11:	Värmepatron
6:	Anordning för införande och borttagande av effusionsceller		

▼M1

1.5.6 **Effusionsmetod: isoterm termogravimetri**

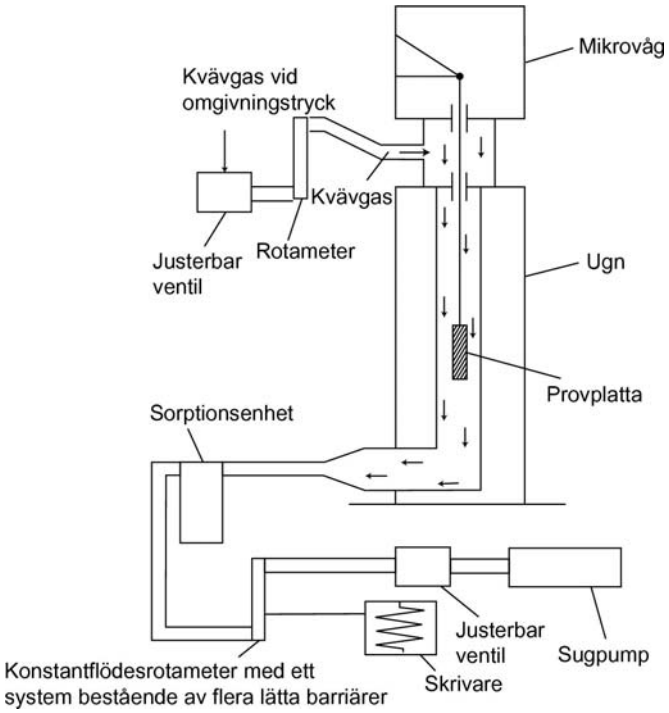
1.5.6.1 *Princip*

Metoden går ut på att testsubstansens påskyndade avdunstningshastigheter bestäms vid höga temperaturer och omgivningstryck med hjälp av termogravimetri (10)(15)(16)(17)(18)(19)(20). Avdunstningshastigheterna v_T är en följd av att man exponerar det valda ämnet för en långsamt strömmande inert gasatmosfär och registrerar viktförlusten vid kända isotermiska temperaturer T (i Kelvin) under lämpliga tidsperioder. Ångtrycket p_T kan beräknas utifrån v_T-värdena genom att man utnyttjar det linjära förhållandet mellan logaritmen av ångtrycket och logaritmen av avdunstningshastigheten. Vid behov kan resultaten extrapoleras till temperaturer på 20 och 25 °C genom regressionsanalys av log p_T som en funktion av 1/T. Den här metoden lämpar sig för ämnen med ångtryck som är så låga som 10^{-10} Pa (10^{-12} mbar) och med en renhet på nära 100 % för att undvika feltolkning av de uppmätta viktförlusterna.

1.5.6.2 *Utrustning*

Den allmänna principen för försöksuppställningen visas i figur 7.

Figur 7



Provplattan, som hänger på en mikrovåg i en temperaturkontrollerad kammare, spolas med en kvävgasström som för bort förångade molekyler av testsubstansen. När gasströmmen kommer ut från kammaren renas den i en sorptionsenhet.

1.5.6.3 *Förfarande*

Testsubstansen appliceras i ett jämnt skikt på en uppruggad glasplatta. Fasta ämnen löses i lämpligt lösningsmedel och lösningen appliceras i ett jämnt skikt på plattan, som sedan får torka i en inert atmosfär. Vid mätningen hängs den belagda plattan upp i den termogravimetriska analysatorn och viktförlusten mäts kontinuerligt som en funktion av tiden.

▼M1

Avdunstningshastigheten v_T vid en given temperatur beräknas utifrån provplattans viktförlust Δm enligt följande formel:

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

där F är det applicerade testsubstansens ytarea (normalt densamma som provplattans ytarea) och t är den tid under vilken viktförlusten Δm registreras.

Ångtrycket p_T kan sedan beräknas som en funktion av avdunstningshastigheten v_T:

$$\mathrm{Log}\ p_T = C + D\ \log\ v_T$$

där C och D är konstanter som är specifika för den använda försöksuppställningen och som beror på mätkammarens temperatur och på gasflödeshastigheten. Dessa konstanter måste bestämmas genom mätning av ett antal föreningar med känt ångtryck och regression av log p_T som en funktion av log v_T (11)(21)(22).

Förhållandet mellan ångtrycket p_T och temperaturen T i Kelvin erhålls genom följande formel:

$$\mathrm{Log}\ p_T = A + B\ 1/T$$

där A och B är konstanter som erhålls genom regression av log p_T som en funktion av 1/T. Med hjälp av denna formel kan ångtrycket beräknas för vilken annan temperatur som helst genom extrapolering.

1.5.7 **Gasmättnadsmetod** (23)

1.5.7.1 *Princip*

Inert gas vid rumstemperatur och med känd flödeshastighet leds genom eller över ett prov av testsubstansen, så långsamt att gasen mättas. Det är ytterst viktigt att uppnå mättnad i gasfasen. Den substans som transporteras med gasen samlas upp, vanligen med hjälp av en adsorbent, och mängden bestäms. Som ett alternativ till uppsamling av ånga och efterföljande analys kan en metod för direktanalys, t.ex. gaskromatografi, användas för kvantitativ bestämning av den mängd ämne som transporteras. Beräkningen av ångtrycket grundas på antagandet att allmänna gaslagen gäller och att det totala trycket i en gasblandning är lika med summan av de ingående gasernas tryck. Testsubstansens deltryck, dvs. ångtryck, beräknas utifrån den kända totala gasvolymen och utifrån det transporterade materialets vikt.

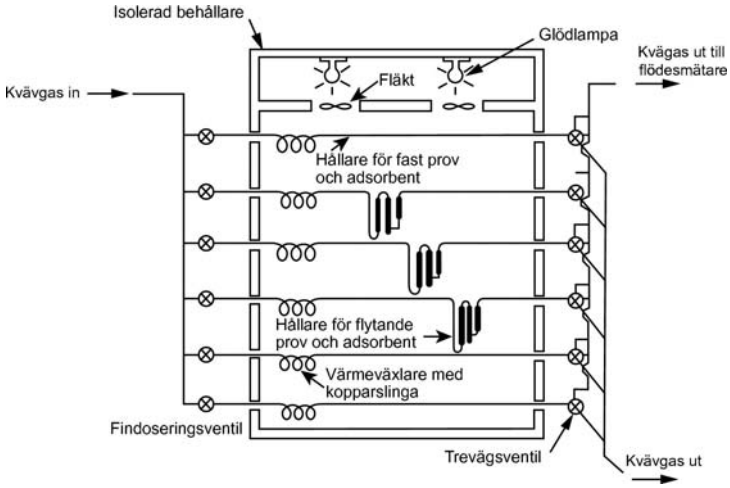
Gasmättnadsmetoden kan användas för både fasta och flytande ämnen. Den kan användas för ångtryck ned till 10^{-10} Pa (10)(11)(12)(13)(14), men är mest tillförlitlig för ångtryck under 10^3 Pa. Vid högre tryck än 10^3 Pa överskattas vanligen ångtrycket, troligen beroende på aerosolbildning. Eftersom ångtrycket mäts vid rumstemperatur är det inte nödvändigt att extrapolera data från mätningar som görs vid höga temperaturer. Sådan extrapolering kan annars ge upphov till stora fel.

1.5.7.2 *Utrustning*

I den här metoden används en behållare med konstant temperatur. Teckningen i figur 8 visar en behållare innehållande sex provhållare – tre för fasta prover och tre för flytande prover – så att man samtidigt kan göra tre analyser av antingen ett fast eller flytande prov. Temperaturvariationen får vara högst ±0,5 °C.

▼**M1**

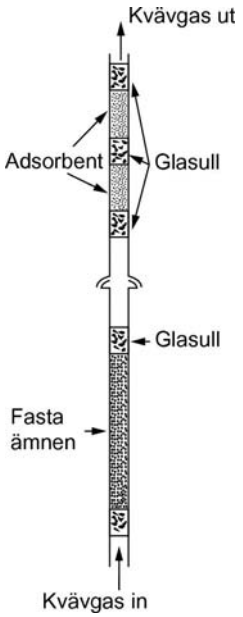
Figur 8



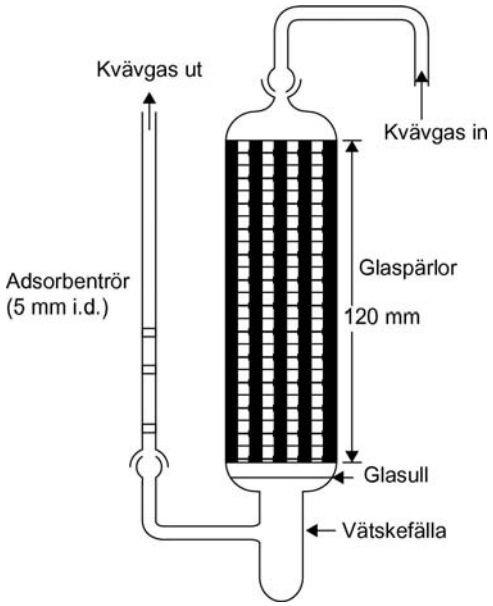
Vanligen används kväve som inert bärgas, men ibland kan det vara nödvändigt att använda en annan gas (24). Bärgasen måste vara torr. Gasströmmen delas upp i sex delströmmar med hjälp av nålventiler (med en öppning på ca 0,79 mm) och leds in i behållaren genom ett kopparrör med 3,8 mm innerdiameter. När en jämn temperatur uppnåtts leds gasen genom provet och adsorbentfällan och därefter ut ur behållaren.

Fasta prover laddas i glasrör med 5 mm innerdiameter som försluts med glasull i båda ändarna (se figur 9). I figur 10 visas en hållare och ett adsorbentsystem för flytande prover. Den mest reproducerbara metoden för att mäta vätskors ångtryck är att belägga glaspärlor eller en inert adsorbent såsom kiseldioxid med vätskan och att packa hållaren med dessa kulor eller denna adsorbent. Alternativt kan man låta bärgasen passera genom grov fritta och bubbla genom en kolonn av den flytande testsubstansen.

Figur 9



Figur 10



▼M1

Adsorbentröret har två delar som är fyllda med adsorbent – en främre del och en bakre del som fungerar som reserv. Vid mycket låga ångtryck fångas endast små mängder av testsubstansen upp på adsorbenten. Adsorptionen i glasullen och på glasrörets väggar mellan provet och adsorbenten kan då utgöra ett stort problem.

Fällor som kyls med kolsyreis är ett annat effektivt sätt att samla upp förångad substans. De ger inte något baktryck på mättningskolonnen och det är också lättare att avlägsna det uppfångade materialet kvantitativt från kylfällan.

1.5.7.3 *Förfarande*

Den utgående bärgasens flödeshastighet mäts vid rumstemperatur. Flödeshastighten måste kontrolleras ofta under försökets gång för att säkerställa att det finns ett korrekt värde för hela bärgasvolymen. Kontinuerlig mätning med en massflödesmätare är att föredra. Det kan krävas en lång kontakttid och följaktligen relativt låga flödeshastigheter för att uppnå mättnadskoncentration i gasfasen (25).

I slutet av försöket analyseras de båda delarna av adsorbenten var för sig. Den adsorberade substansen i vardera delen av adsorbentröret desorberas genom extraktion med lösningsmedel. De resulterande lösningarna analyseras kvantitativt för att bestämma vikten på den substans som desorberas från varje del av röret. Valet av analysmetod (liksom valet av adsorbent och lösningsmedel för extraktionen) beror på vilken typ av testsubstans det är fråga om. Desorptionseffektiviteten bestäms genom att man injicerar en känd mängd av testsubstans på adsorbenten, desorberar den och analyserar den desorberade mängden. Det är viktigt att kontrollera desorptionseffektiviteten vid samma eller liknande koncentration som provets koncentration och under samma försöksbetingelser.

För att försäkra sig om att bärgasen är mättad med testsubstansen används tre olika gasflödeshastigheter. Om det beräknade ångtrycket är konstant vid olika flödeshastigheter antas gasen vara mättad.

Ångtrycket beräknas enligt följande formel:

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

där:

p = ångtrycket (Pa)

W = den avdunstade testsubstansens massa (g)

V = den mättade gasens volym (m^3)

R = den allmänna gaskonstanten, dvs. 8,314 (J mol^{-1} K^{-1})

T = temperaturen (K)

M = testsubstansens molmassa (g mol^{-1})

De uppmätta volymerna måste korrigeras för tryck- och temperaturskillnader mellan flödesmätaren och mättningskolonnen.

▼M1

1.5.8 **Rotormetod**

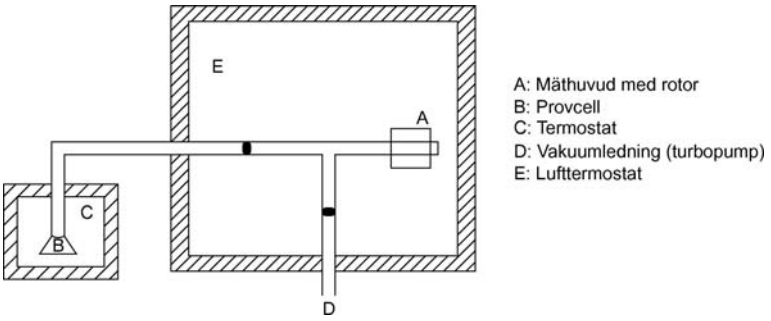
1.5.8.1 *Princip*

I den här metoden används en viskositetsmätare bestående av en rotor, där mätelementet utgörs av en liten stålkula som svävar i ett magnetfält och sätts i rörelse genom roterande fält (26)(27)(28). Kulans rotationshastighet kan mätas med hjälp av detektorspolar. När kulan har nått en viss rotationshastighet, vanligen omkring 400 varv per sekund, avbryts energitillförseln och gasfriktionen börjar bromsa kulans rotation. Minskningen av rotationshastigheten mäts som en funktion av tiden. Ångtrycket bestäms utifrån stålkulans tryckberoende avsaktning. Det rekommenderade ångtrycksintervallet är 10^{-4} till 0,5 Pa.

1.5.8.2 *Utrustning*

En schematisk ritning av försöksuppställningen visas i figur 11. Mäthuvudet placeras i en inneslutning som hålls vid konstant temperatur, reglerad inom 0,1 °C. Provbehållaren placeras i en separat inneslutning, även den reglerad inom 0,1 °C. För att förhindra kondensation hålls alla andra delar av försöksuppställningen vid högre temperatur. Hela utrustningen ansluts till ett vakuumsystem.

Figur 11



2. **DATA OCH RAPPORTERING**

2.1 DATA

Ångtrycket ska bestämmas med en av de ovan beskrivna metoderna och vid minst två temperaturer. För att kontrollera ångtryckskurvans linjäritet är det önskvärt med tre eller fler bestämningar i intervallet 0–50 °C. För effusionsmetoden (Knudsencell och isoterm termogravimetri) och gasmättnadsmetoden rekommenderas att temperaturen varieras inom intervallet 120–150 °C i stället för 0–50 °C.

2.2 TESTRAPPORT

Testrapporten ska omfatta följande information:

— Använd metod.

▼M1

— Exakt angivelse av ämnet (beteckning och orenheter) och eventuella inledande reningssteg.

— Minst två ångtrycks- och temperaturvärden – helst tre eller fler – i området 0–50 °C (eller 120–150 °C),

— Minst ett av temperaturvärdena bör vara 25 °C eller lägre om detta är tekniskt möjligt med den valda metoden.

— Alla rådata.

— En kurva över log p som funktion av 1/T.

— En uppskattning av ångtrycket vid 20 eller 25 °C.

Om en förändring (ändring av aggregationstillstånd eller nedbrytning) noteras ska följande uppgifter anges:

— Förändringens art.

— Temperatur vid vilken förändringen inträffar vid atmosfäriskt tryck.

— Ångtryck 10 och 20 °C under den temperatur där förändringen inträffar samt 10 och 20 °C över denna temperatur (såvida övergången inte sker från fast form till gasform).

Alla uppgifter och anmärkningar som kan ha betydelse för tolkningen av resultaten ska rapporteras, särskilt vad gäller orenheter och ämnets aggregationstillstånd.

3. **LITTERATUR**

1. *Europeiska gemenskapernas officiella tidning* L 383 A, s. 26–47 (1992).

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

3. Weissberger R., red. (1959). Technique of Organic Chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry, 3.e uppl., vol. I, del I. kapitel IX, Interscience Publ., New York.

4. Glasstone, S. (1946). Textbook of Physical Chemistry, 2:a uppl., 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 20–048 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, s. 1979; (1911), 34, s. 593.

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

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

11. Tomlin, C.D.S. (red.), The Pesticide Manual, 12:e uppl. (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), s. 22–28.

13. Grayson, B.T., Fosbraey, L.A., Pesticide Science 16 (1982), s. 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), s. 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) s. 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), s. 393–400.

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

18. Gückel, W., Kaestel, R., Kroehl, T., Parg, A., Methods for Determining the Vapour Pressure of Active Ingredients Used in Crop Protection. Del IV: An Improved Thermogravimetric Determination Based on Evaporation Rate; Pesticide Science 45 (1995) s. 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. Del V: Thermogravimetry Combined with Solid Phase MicroExtraction (SPME); Pesticide Science 53 (1998) s. 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) s. 1512–1520.

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

22. Meister, R.T. (red.), Farm Chemicals Handbook, vol. 88 (2002)

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

▼**M1**

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

25. Westcott m.fl. (1981). Environ. Sci. Technol. 15, s. 1375.

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

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

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

▼M1

Tillägg

Uppskattningsmetod

INLEDNING

Uppskattade värden på ångtrycket kan användas för att

— bestämma vilken försöksmetod som är lämplig,

— göra en uppskattning eller fastställa ett gränsvärde när det av tekniska skäl inte är möjligt att använda någon av försöksmetoderna.

UPPSKATTNINGSMETOD

Vätskors och fasta ämnens ångtryck kan uppskattas genom användning av den modifierade Watson-korrelationen (a). De enda experimentella data som behövs är den normala kokpunkten. Metoden kan användas i ett tryckintervall från 10^5 Pa till 10^{-5} Pa.

Närmare information om metoden finns i ”Handbook of Chemical Property Estimation Methods” (b). Se även OECD Environmental Monograph nr 67 (c).

BERÄKNINGSFÖRFARANDE

Ångtrycket beräknas enligt följande formel:

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

där:

T = den aktuella temperaturen

T_b = den normala kokpunkten

P_{VP} = ångtrycket vid temperaturen T

ΔH_{Vb} = ångbildningsvärmet

ΔZ_b = kompressionsfaktor (uppskattad till 0,97)

m = empirisk faktor som beror på ämnets aggregationstillstånd och på den aktuella temperaturen.

Dessutom gäller att

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

där K_F är en empirisk faktor som tar hänsyn till ämnets polaritet. I hänvisning b finns det en förteckning med K_F-faktorer för olika typer av föreningar.

▼**M1**

Det är ganska vanligt med data som anger kokpunkten vid sänkt tryck. I sådana fall beräknas ångtrycket enligt följande formel:

$$\ln P_{vp} \approx \ln P_1 + \frac{\Delta H_{v1}}{\Delta Z_b R T_1}\left[1 - \left(3 - 2\frac{T}{T_1}\right)^m \frac{T_1}{T} - 2\,m\left(3 - 2\frac{T}{T_1}\right)^{m-1} ln\ \frac{T}{T_1}\right]$$

där T_1 är kokpunkten vid det lägre trycket P_1.

RAPPORT

När uppskattningsmetoden används ska rapporten omfatta en detaljerad redovisning av beräkningen.

LITTERATUR

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

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

c) OECD Environmental Monograph nr. 67. Application of Structure-Activity Relationships to the Estimation of Properties Important in Exposure Assessment (1993).

▼B

A.5 YTSPÄNNING

1. METOD

De beskrivna metoderna är baserade på OECD:s riktlinjer för undersökning av kemikalier (se hänvisning 1). Grundprinciperna anges i hänvisning 2.

1.1 INLEDNING

De beskrivna metoderna används för matning av ytspänningen hos vattniga lösningar.

Vid utförande av dessa test är det värdefullt att ha förhandskunskap om ämnets löslighet i vatten, dess struktur, hydrolysegenskaper och kritiska koncentrationer för micellbildning.

Följande metoder kan tillämpas på de flesta kemiska ämnen, oavsett renhetsgrad.

Mätning av ytspänning med ringtensiometermetoden är begränsad till vattniga lösningar med en dynamisk viskositet på mindre än 200 m Pa s.

1.2 DEFINITIONER OCH ENHETER

Den fria entalpinytan per ytareaenhet betecknas som ytspänning.

Ytspänningen anges som:

N/m (SI-enhet) eller

mN/m (SI-underenhet).

1 N/m = 10^3 dyn/cm

1 mN/m = dyn/cm i det gamla cgs-systemet.

1.3 REFERENSÄMNEN

Man behöver inte använda referensämnen varje gång ett nytt ämne ska undersökas. Referensämnen ska först och främst användas för att då och då kontrollera metoden och för jämförelse med resultat som uppnåtts med andra metoder.

I hänvisningarna 1 och 3 anges referensämnen som täcker ett stort antal ytspänningar.

1.4 TESTMETODSPRINCIPER

Metoderna är baserade på mätning av den största kraft som ska utövas vertikalt på en bygel eller ring i kontakt med vätskeytan av ett prov som ska undersökas i ett mätkärl för att bryta denna kontakt, eller den vertikala kraft som behöver utövas på en platta vars ena kant har kontakt med vätskeytan, för att lösgöra film som har bildats.

Ämnen vars löslighet i vatten är minst 1 mg/liter testas i en vattnig lösning vid en enda koncentration.

1.5 KVALITETSKRITERIER

Dessa metoder kan ge större noggrannhet än vad som kan förväntas krävas vid miljöbetingade undersökningar.

▼B

1.6 METODBESKRIVNING

En lösning av ämnet framställs i destillerat vatten. Koncentrationen av denna lösning ska vara 90 % av ämnets mättnadskoncentration i vatten. Om denna koncentration är större än 1 g/l används en koncentration av 1 g/l för testet. Ämnen med en löslighet i vatten på mindre än 1 mg/l behöver inte testas.

1.6.1 **Plattmetoden**

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

1.6.2 **Bygelmetoden**

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

1.6.3 **Ringmetoden**

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

1.6.4 **OECD-harmoniserad ringmetod**

1.6.4.1 *Apparatur*

Denna mätning kan göras med kommersiellt tillgängliga tensiometrar och består av följande delar:

— flyttbart provbord,

— kraftmätningssystem,

— mätkropp (ring),

— mätkärl.

1.6.4.1.1 Flyttbart provbord

Det flyttbara provbordet används som stöd till det temperaturreglerade mätkärl som innehåller den vätska som ska undersökas. Det är monterat på ett stativ tillsammans med kraftmätningssystemet.

1.6.4.1.2 Kraftmätnings system

Kraftmätningssystemet (se figur) är placerat över provbordet. Osäkerheten vid kraftmätningen får inte vara större än ± 10^{-6} N, motsvarande en felmarginal på ±0,1 mg viktmätning. Oftast är mätskalan på kommersiellt tillgängliga tensiometrar indelad i mN/m så att ytspänningen kan avläsas direkt i mN/m med en noggrannhet på 0,1 mN/m.

▼B

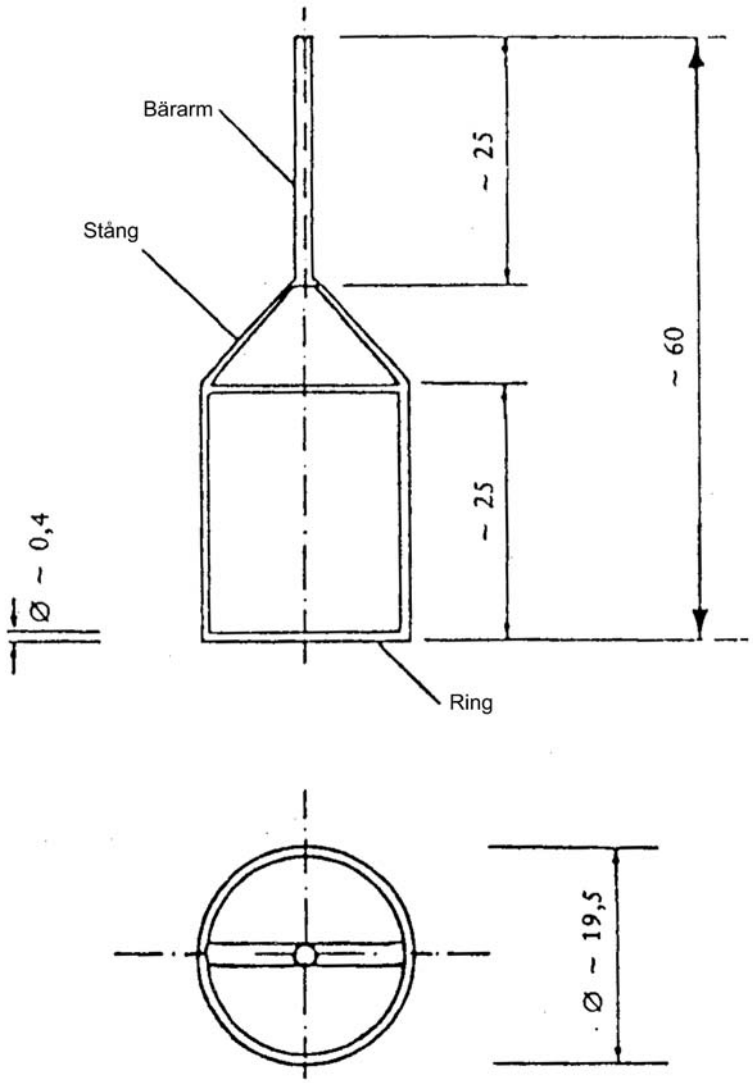
1.6.4.1.3 Mätkropp (ring)

Ringen är vanligtvis gjord av en tråd av platina-indium, ungefär 0,4 mm tjock och med en medelomkrets på 60 mm. Trådringen är upphängd horisontellt på en metallstång och en bärarm av tråd, som utgör anslutningen till kraftmätningssystemet (se figur).

Figur

Mätkropp

(Alla mått är angivna i mm)



1.6.4.1.4 Mätkärl

Mätkärlet som innehåller den testlösning som ska mätas ska vara ett temperaturreglerat glaskärl. Det ska vara så utformat att temperaturen på provlösningen och på gasfasen ovanför dess yta förblir konstant under mätningen så att provet inte kan avdunsta. Cylindriska glaskärl med en innerdiameter på minst 45 mm kan användas.

▼B

1.6.4.2 *Iordningställande av apparaturen*

1.6.4.2.1 Rengöring

Glaskärl ska rengöras noggrant. Vid behov ska de diskas med varm kromsvavelsyra och därefter med tjockflytande fosforsyrelösning (83–98 % per vikt H_3PO_4), sedan noggrant sköljas i kranvatten och slutligen diskas i omdestillerat vatten tills en neutral reaktion erhålls. Slutligen ska de torkas eller sköljas med en del av den provvätska som ska mätas.

Ringen ska först sköljas noggrant i vatten för att avlägsna eventuella vattenlösliga ämnen. Därefter ska den nedsänkas hastigt i kromsvavelsyra, tvättas i omdestillerat vatten tills en neutral reaktion erhålls och slutligen upphettas hastigt över en metanollåga.

Anmärkning:

Förorening med ämnen som inte löses eller förstörs av kromsvavelsyra eller fosforsyra, t.ex. silikonpreparat, ska avlägsnas med hjälp av lämpligt organiskt lösningsmedel.

1.6.4.2.2 Kalibrering av apparaten

Kalibreringen av apparaten består i att nollpunkten kontrolleras och justeras så att instrumentets indikering medger en tillförlitlig avläsning i mN/m.

Montering;

Apparaten ska planriktas, t.ex med användning av ett vattenpass på tensiometerns fot, varefter nivåskruvarna på foten justeras.

Nollpunktsjustering:

När ringen har monterats på apparaten men innan den nedsänks i vätskan, ska tensiometerindikeringen justeras till noll och ringen kontrolleras så att den är parallell med vätskeytan. För detta ändamål kan vätskeytan användas som spegel.

Kalibreringar:

Själva provkalibreringen kan utföras genom en av följande två metoder:

a) Användning av en vikt: detta är ett förfarande där ryttare av känd vikt mellan 0,1 och 1,0 g placeras på ringen. Kalibreringsfaktorn Φ_a, med vilken alla instrumentavläsningar ska multipliceras, bestäms enligt följande ekvation (se hänvisning 1):

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

där:

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

m = ryttarens vikt (g)

g = tyngdaccelerationen (981 cm s^{-2} vid havsytan)

b = ringens medelomkrets (cm)

σ_4 = tensiometeravläsningen efter placering av ryttaren på ringen (mN/m).

▼B

b) Användning av vatten: detta är ett förfarande där det används rent vatten vars ytspänning vid, t.ex. 23 °C, är lika med 72,3 mN/m. Denna metod är snabbare att utföra än viktkalibreringen men risken finns alltid att vattnets ytspänning har ändrats genom förorening av ytaktiva substanser.

Kalibreringsfaktorn Φ_b med vilken alla instrumentavläsningar ska multipliceras, bestäms enligt följande ekvation (2):

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

där:

σ_o = i litteraturen angivet värde för vattens ytspänning (mN/m)

σ_g = mätt värde för vattnets ytspänning (mN/m) båda vid samma temperatur.

1.6.4.3 *Iordningställande av prov*

Vattniga lösningar framställs med passande koncentrationer av de ämnen som ska undersökas. Lösningarna får inte innehålla några olösta ämnen.

Lösningarna ska hållas vid en konstant temperatur (±0,5 °C). Eftersom en lösnings ytspänning i mätkärlet ändras med tiden ska flera mätningar göras vid olika tidpunkter och en kurva ritas över ytspänning som en funktion av tiden. När ytspänningen inte längre ändras har ett jämviktstillstånd uppnåtts.

Damm och gasformig förorening av andra ämnen påverkar mätningen. Arbetet ska därför utföras under en skyddskåpa.

1.6.5 **Testbetingelser**

Mätningen ska göras vid ungefär 20 °C och hållas inom ±0,5 °C.

1.6.6 **Testförfarande**

De lösningar som ska mätas fylls i det noggrant rengjorda kärlet varvid skumbildning ska undvikas. Mätkärlet placeras på apparatens provbord. Bordsytan med mätkärlet ska höjas tills ringen är helt nedsänkt i den lösning som ska mätas. Därefter ska bordsytan sänkas gradvis och jämt (med en hastighet av ungefär 0,5 cm/min) för att lösgöra ringen från ytan tills den största kraften har uppnåtts. Det vätskelager som vidhäftar ringen får inte avlägsnas från ringen. När mätningen är gjord ska ringen åter nedsänkas helt i lösningen och mätningen upprepas till dess att ett konstant ytspänningsvärde erhålls. Den tid som går åt från överföring av lösningen till mätkärlet och tills mätningen görs ska antecknas för varje bestämning. Avläsningar ska göras vid den största kraft som behövs för att lösgöra ringen från vätskans yta.

▼B

2. **DATA**

För att beräkna ytspänningen ska det på apparaten i mN/m avlästa värdet först multipliceras med kalibreringsfaktor Φ_a, eller Φ_b (beroende på vilken kalibreringsmetod som används). Detta ger endast ett ungefärligt värde som ska korrigeras.

Harkins och Jordan (se hänvisning 4) har empiriskt bestämt korrektionsfaktorer för ytspänningsvärden som är bestämda med ringmetoden. Dessa faktorer är beroende av ringens mått, vätskans densitet och dess ytspänning.

Eftersom det är besvärligt att för varje enskild mätning bestämma korrektionsfaktorn utifrån Harkins och Jordans tabeller, kan man vid beräkning av ytspänningen hos vattenlösningar använda den förenklade metoden att avläsa de korrigerade ytspänningsvärdena direkt i tabellen. (Interpolation ska användas för avläsningar som ligger mellan tabellvärdena.)

Tabell

Korrektion av den mätta ytspänningen

Endast för vattniga lösningar, $\rho = 1\ g/cm^3$

r	9,55 mm (genomsnittlig ringradie)
r	0,185 mm (ringtrådens radie)

Experimentellt värde (mN/m)	Korrigerat värde (mN/m)	
	Viktkalibrering (se 1.6.4.2.2 a)	Vattenkalibrering (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

Experimentellt värde (mN/m)	Korrigerat värde (mN/m)	
	Viktkalibrering (se 1.6.4.2.2 a)	Vattenkalibrering (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	—

Denna tabell är utarbetat efter Harkins-Jordans korrektion och liknar den som finns i DIN-standarden (DIN 53914) för vatten och vattniga lösningar (densitet p = 1 g/cm^3) och är avsedd för en kommersiellt tillgänglig ring med mitten R = 9,55 mm (genomsnittlig ringradie) och r = 0,185 mm (ringtrådens radie). Tabellen ger korrigerade värden för ytspänning som mätts efter kalibrering med vikt eller vatten.

Alternativt kan ytspänningen utan föregående kalibrering beräknas enligt följande formel:

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

där:

F = kraften mätt på dynamometern när hinnan bryts

R = ringens radie

f = korrektionsfaktorn (se hänvisning 1)

3. **RAPPORTERING**

3.1 TESTRAPPORT

Testrapporten ska om möjligt innehålla minst följande uppgifter:

— Använd metod.

— Använd typ av vatten eller lösning.

— Exakt specificering av ämnet (beteckning och orenheter).

— Mätresultat: ytspänning (avläsning) med uppgift om både enskilda avläsningar och deras aritmetiska medelvärde och det korrigerade medelvärdet (med hänsyn tagen till apparaturfaktorn och korrektionstabellen).

▼B

— Lösningens koncentration.

— Testtemperaturen.

— Den använda lösningens ålder, särskilt tidsåtgången mellan framställning och mätning av lösningen.

— Beskrivning av ytspänningens tidsberoende efter överföring av lösningen till mätkärlet.

— Alla uppgifter och upplysningar som är av betydelse för tolkningen av resultaten ska rapporteras, i synnerhet med avseende på orenheter och ämnets fysiska tillstånd.

3.2 TOLKNING AV RESULTAT

Med tanke på att destillerat vatten har en ytspänning av 72,75 mN/m vid 20 °C anses ämnen med en ytspänning på mindre än 60 mN/m bestämd genom denna metod vara ytspänningsaktiva ämnen.

4. **HÄNVISNINGAR**

1. OECD, Paris, 1981, Test Guideline 115, rådets beslut K(S1) 30 slutligt.

2. R. Weissberg ed.: Technique of Organic Chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed., Inter-science Publ., New York, 1959, vol. I, del I, kapitel XIV.

3. Pure Appl. Chem., 1976, vol. 48, s. 511.

4. Harkins, W. D., Jordan, H. R, J. Amer. Chem. Soc, 1930, vol. 52, s. 1751.

▼M4

A.6 VATTENLÖSLIGHET

INLEDNING

1. Den här testmetoden motsvarar OECD:s testriktlinje (TG) 105 (1995). Den här testmetoden är en reviderad version av den ursprungliga TG 105 vilken antogs 1981. Det finns ingen skillnad i sak mellan nuvarande version och den från 1981. Huvudsakligen har utformningen ändrats. Ändringen baserades på EU:s testmetod ”Vattenlöslighet” ([1]).

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN

2. Ett ämnes vattenlöslighet kan påverkas avsevärt av förekomsten av orenheter. Den här testmetoden behandlar bestämningen av löslighet i vatten av i huvudsak rena ämnen som är stabila i vatten och inte flyktiga. Innan man kan göra en bestämning av vattenlöslighet är det användbart med några preliminära uppgifter om testämnet, såsom strukturformel, ångtryck, dissocationskonstant och hydrolys som en funktion av pH.

3. Två metoder finns beskrivna här: kolonnelueringsmetoden och kolvmetoden som täcker respektive löslighet under och över 10^{-2} g/l. Ett enkelt inledande test finns också beskrivet. Det anger det ungefärliga lämpliga antalet provtagningar för det slutliga testet, liksom den tid som åtgår för att uppnå mättnad.

DEFINITIONER OCH ENHETER

4. Ett ämnes löslighet i vatten är mättnadskoncentrationen av det ämnet i vatten vid en given temperatur.

5. Vattenlöslighet uttrycks i mängden löst ämne per volym av lösningen. SI-enheten är kg/m^3, men g/l kan också användas.

REFERENSKEMIKALIER

6. Referenskemikalier behöver inte användas vid undersökning av ett testämne.

BESKRIVNING AV METODER

Testbetingelser

7. Testet ska helst utföras vid temperaturen 20 ± 0,5 °C. Den valda temperaturen ska hållas konstant i utrustningens alla relevanta delar.

Inledande test

8. I ett stegvist förfarande ska ökande volymer vatten vid rumstemperatur tillsättas till ca 0,1 g av provet (fasta testämnen måste pulvriseras) i ett 10 ml mätglas med glaspropp. Blandningen skakas i 10 minuter efter varje tillsats av vatten och avsynas för eventuella oupplösta delar av provet. Om provet eller delar av det fortfarande inte är upplöst efter tillsats av 10 ml vatten ska försöket fortgå i ett 100 ml mätglas. Den ungefärliga lösligheten anges i

▼M4

tabell 1 för den volym vatten där fullständig upplösning av provet sker. Det kan ta lång tid att lösa upp ett testämne när lösligheten är låg och minst 24 timmar bör avsättas för det. Om testämnet efter 24 timmar fortfarande inte är upplöst bör man avsätta längre tid (upp till 96 timmar), eller mer späda ut mer för att kunna fastställa om kolonnelueringsmetoden eller kolvmetoden bör användas.

Tabell 1

ml vatten för 0,1 g löslig	0,1	0,5	1	2	10	100	> 100
Ungefärlig löslighet i g/l	> 1 000	1 000 till 200	200 till 100	100 till 50	50 till 10	10 till 1	< 1

Kolonnelueringsmetoden

Principen

9. Den här metoden bygger på elueringen av ett testämne med vatten från en mikrokolonn laddad med ett inert bärämne, som tidigare belagts med ett överskott av testämnet (2). Vattenlösligheten ges av eluatets masskoncentration när denna har nått en platå som en funktion av tiden.

Utrustning

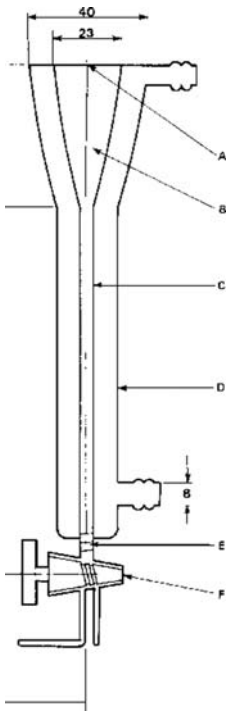
10. Utrustningen består av en mikrokolonn (figur 1), som hålls i konstant temperatur. Den är antingen ansluten till en cirkulationspump (figur 2) eller ett nivåkärl (figur 3). Mikrokolonnen innehåller en inert bärare som hålls på plats av en liten plugg av glasull som också används för att filtrera partiklar. Material som kan användas som bärare är glaspärlor, kiselgur eller andra inerta material.

11. Mikrokolonnen som visas i figur 1 är lämplig för uppställningen av cirkulationspumpen. Den har ett gasutrymme för fem bäddvolymer (kasseras i början av försöket) och volym för fem prover (som tas bort för analys under försöket). Ett annat alternativ är att minska storleken om vatten kan tillsättas under försöket som ersättning för de fem första bäddvolymerna med orenheter som har avlägsnats. Kolonnen är ansluten till cirkulationspumpen med ett rör tillverkat i ett inert material med en kapacitet på ca 25 ml/tim. Cirkulationspumpen kan t.ex. vara en peristaltisk pump eller en membranpump. Försiktighet måste iakttas så att ingen förorening och/eller adsorption uppstår i rörmaterialet.

12. Ett schematiskt arrangemang med ett nivåkärl visas i figur 3. I detta arrangemang är mikrokolonnen försedd med en envägsventil. Anslutningen till nivåkärlet består av inslipad hals och rör tillverkat i ett inert material. Flödeshastigheten från nivåkärlet bör vara ca 25 ml/tim.

▼**M4**

Figur 1



Dimensioner i mm

A. Anslutning för inslipad hals

B. Gasutrymme

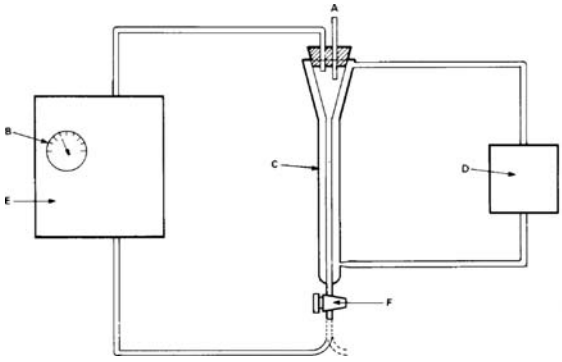
C. Inner 5

D. Ytter 19

E. Plugg av glasull

F. Envägsventil

Figur 2



A. Atmosfärisk jämvikt

B. Flödesmätare

C. Mikrokolonn

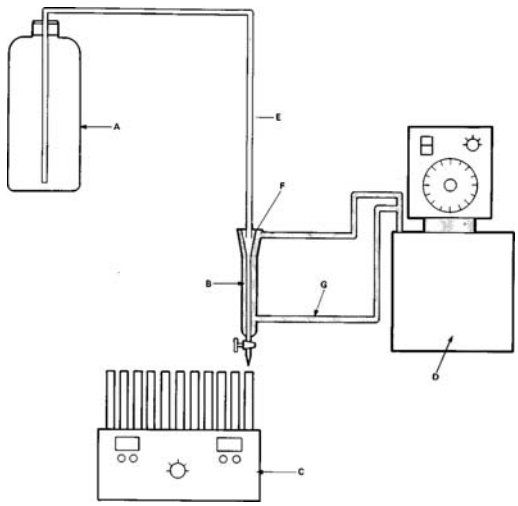
D. Termostatreglerad cirkulationspump

E. Cirkulationspump

F. Tvåvägsventil för provtagning

▼M4

Figur 3



A. Nivåkärl (t.ex. 2,5 liter kemisk kolv)

B. Kolonn

C. Fraktionsackumulator

D. Termostat

E. Teflonrör

F. Inslipad hals

G. Vattenlinje (mellan termostat och kolonn, innerdiameter ca 8 mm)

13. Ca 600 mg bärämne överförs till en 50 ml rundbottnad kolv. En lämplig mängd av testämnet upplöses i ett flyktigt lösningsmedel av analytisk reagenskvalitet och en lämplig volym av denna lösning tillsätts bärämnet. Lösningsmedlet avdunstas fullständigt, t.ex. med hjälp av en rotationsförångare, i annat fall uppnår bäraren ingen vattenmättnad under elueringssteget på grund av uppdelning på ytan. Det laddade bärämnet blötläggs två timmar i ca 5 ml vatten och suspensionen hälls i mikrokolonnen. Alternativt kan torrt laddat bärämne hällas i den vattenfyllda mikrokolonnen, och två timmar avsätts för ekvilibrering.

14. Laddning av bärämnet kan ge problem som leder till felaktiga resultat, t.ex. om testämnet utfälls som en olja. Man bör se närmare på dessa problem och rapportera detaljerna.

Procedur vid användning av en cirkulationspump

15. Flödet genom kolonnen startas. En flödeshastighet på ca 25 ml/tim rekommenderas vilket motsvarar 10 bäddvolymer i timmen för den beskrivna kolonnen. För borttagning av vattenlösliga orenheter ska minst de fem första bäddvolymerna kasseras. Efter detta ska pumpen vara på tills jämvikt uppnås, vilket definieras som fem successiva prov vilkas koncentrationer inte skiljer sig åt med mer än ± 30 % på ett slumpmässigt sätt. Proven bör vara skilda från varandra med ett tidsintervall som motsvarar genomströmningen av minst tio bäddvolymer. Beroende på den analysmetod som används upprättas en koncentrations-/tidskurva för att visa att jämvikt har uppnåtts.

▼M4

Procedur vid användning av ett nivåkärl

16. Successiva fraktioner av eluatet samlas in och analyseras med den valda metoden. Fraktioner av eluatet från mellanintervallet, där koncentrationerna är konstanta inom ± 30 % av minst fem successiva fraktioner, används för att fastställa lösligheten.

17. Det föredragna eluatet är dubbeldestillerat vatten. Avjoniserat vatten med en resistivitet på över 10 megaohm/cm och ett totalt innehåll av organiskt kol lägre än 0,01 % kan också användas.

18. För båda procedurerna utförs en andra omgång, med halverad flödeshastighet jämfört med den första. Testet är lyckat om resultatet från de två omgångarna överensstämmer. Om den uppmätta lösligheten är högre med den lägre flödeshastigheten, måste halveringen av flödeshastigheten fortsätta tills två successiva omgångar ger samma löslighet.

19. I båda förfarandena ska fraktionerna kontrolleras beträffande förekomsten av kolloidalt material genom undersökning av Tyndalleffekten. Förekomsten av partiklar gör testet ogiltigt, och testet ska upprepas efter förbättringar av kolonnens filtrering.

20. Varje provs pH mäts med särskilda indikatorremsor.

Kolvmetoden

Principen

21. Testämnet (fasta ämnen måste pulvriseras) löses upp i vatten vid en temperatur som ligger strax över testtemperaturen. När mättnad har uppnåtts kyls blandningen och hålls vid testtemperaturen. Om man genom lämplig provtagning säkerställer att mättnadsjämvikt har uppnåtts kan mätningen utföras direkt vid testtemperaturen. Därefter bestäms masskoncentrationen av testämnet i vattenlösningen, vilken inte får innehålla några olösta partiklar, genom en lämplig analysmetod (3).

Utrustning

22. Följande material behövs:

— Vanliga laboratorieglas och instrument.

— En anordning för omskakning av lösningar vid kontrollerad, konstant temperatur.

— En centrifug (företrädesvis termostatreglerad) om det behövs.

— Analysutrustning.

Procedur

23. Efter det inledande testet bestäms den nödvändiga mängden testämne som behövs för att mätta den önskade volymen vatten. Ungefär fem gånger den mängden vägs in i var och en av de tre glaskärlen utrustade med glasproppar (t.ex. centrifugrör, kolvar). En volym vatten, som valts efter analysmetod och löslighetsintervall, tillsätts varje kärl. Kärlen försluts och skakas sedan vid 30 °C. Man bör använda en skak- eller omrörningsutrustning som kan hålla en konstant temperatur, t.ex. magnetisk omrörning i ett termostatreglerat vattenbad. Efter en dag ekvilibreras ett av kärlen under 24 timmar vid testtemperaturen, med enstaka skakningar. Kärlets innehåll centrifugeras vid testtemperaturen, och koncentrationen av testämnet i den klara vattenfasen

▼M4

bestäms genom en lämplig analysmetod. De andra bägge kolvarna behandlas likartat efter en initial ekvilibrering vid 30 °C i två, respektive tre, dagar. Testet är lyckat om den uppmätta koncentrationen i åtminstone två av de sista kärlen inte avviker med mer än 15 %. Om resultaten från kärl 1, 2 och 3 visar ökande värden, bör hela testet göras om med längre ekvilibreringstider.

24. Testet kan också utföras utan föregående inkubation vid 30 °C. För att uppskatta graden av etablering av mättnadsjämvikten tas prover tills omrörning inte längre påverkar de uppmätta koncentrationerna.

25. Varje provs pH mäts med särskilda indikatorremsor.

Analytiska bestämningar

26. En ämnesspecifik metod är att föredra eftersom små mängder lösliga orenheter kan orsaka stora fel i den uppmätta lösligheten. Exempel på sådana metoder är gas- eller vätskekromatografi, titrering, fotometri och voltametri.

DATA OCH RAPPORTERING

Data

Kolonnelueringsmetoden

27. För varje omgång ska medelvärde och standardavvikelse beräknas från minst fem på varandra följande prov som tas från mättnadsplatån. De medelvärden som erhållits från två tester med olika flöden bör inte avvika med mer än 30 %.

Kolvmetoden

28. Medelvärdet beräknas för de individuella resultaten från var och en av de tre kolvarna, vilka inte bör avvika med mer än 15 %.

Testrapport

Kolonnelueringsmetoden

29. Testrapporten måste innehålla följande information:

— Resultat från det inledande testet.

— Kemisk beteckning och orenheter (eventuellt inledande reningssteg).

— Koncentrationer, flödeshastigheter och pH för varje prov.

— Medelvärden och standardavvikelser från minst fem prov från mättnadsplatån för varje omgång.

— Medelvärdet av minst två successiva omgångar.

— Temperaturen på vattnet under mättnadsförloppet.

— Analysmetod.

— Typ av bärämne.

— Laddning av bärämnet.

— Lösningsmedel som används.

— Tecken på eventuell kemisk instabilitet hos ämnet under testet.

— All information som är relevant för tolkningen av resultaten, särskilt med avseende på orenheter och fysikaliskt tillstånd hos testämnet.

▼**M4**

Kolvmetoden

30. Testrapporten måste innehålla följande information:

— Resultat från det inledande testet.

— Kemisk beteckning och orenheter (eventuellt inledande reningssteg).

— Enskilda analytiska bestämningar och medelvärde, om fler än ett värde fastställdes för varje kolv.

— pH för varje prov.

— Medelvärdet för olika kolvar vilka var i överensstämmelse.

— Testtemperatur.

— Analysmetod.

— Tecken på eventuell kemisk instabilitet hos ämnet under testet.

— All information som är relevant för tolkningen av resultaten, särskilt med avseende på orenheter och fysikaliskt tillstånd hos testämnet.

LITTERATUR

(1) Kommissionens direktiv 92/69/EEG av den 31 juli 1992 om anpassning till tekniska framsteg för sjuttonde gången av rådets direktiv 67/548/EEG om tillnärmning av lagar och andra författningar om klassificering, förpackning och märkning av farliga ämnen, EGT L 383, 29.12.1992, s. 113–114.

(2) NF T 20-045 (AFNOR) (september 1985). Kemiska produkter för industriell användning – Fastställande av vattenlöslighet för fasta ämnen och vätskor med låg löslighet – kolonnelueringsmetoden.

(3) NF T 20-046 (AFNOR) (september 1985). Kemiska produkter för industriell användning – Fastställande av vattenlöslighet av fasta ämnen och vätskor med hög löslighet – kolvmetoden.

▼B

A.8 FÖRDELNINGSKOEFFICIENT

1. METOD

Den beskrivna ”skakkolvmetoden” är baserade på OECD:s riktlinjer för undersökning av kemikalier (se hänvisning 1).

1.1 INLEDNING

Vid utförande av detta test är det värdefullt att ha förhandskunskap om ämnets strukturformel, dissociationskonstant, hydrolys, löslighet i n-oktansyra och ytspänning.

Mätningar på joniserbara ämnen utförs på den icke-joniserade formen (fri syra eller fri bas), dvs. genom användning av en passande buffert med ett pH-värde av minst 1 enhet under (fri syra) eller över (fri bas) ämnets pK-värde.

Testmetoden omfattar två särskilda förfaranden: skakkolvmetoden och högpresterande vätskekromatografi (HPLC). Den första metoden är användbar när värden av log P_{ow} (se definitionerna nedan) ligger mellan - 2 och 4, och den andra metoden i området mellan 0 och 6. Innan endera försöksmetoden inleds ska en preliminär uppskattning av fördelningskoefficienten erhållas.

Skakkolvmetoden kan endast användas för väsentligen rena ämnen som är lösliga i vatten och n-oktan. Den kan inte användas för ytaktiva ämnen (för vilka ett beräknat värde eller en uppskattning grundad på lösligheten i vatten respektive n-oktan bör finnas).

HPLC-metoden kan inte användas för starka syror och baser, metallkomplexer, ytaktiva ämnen och ämnen som reagerar med elueringsmedlet. För sådana material används ett beräknat eller uppskattat värde på grundval av lösligheten i n-oktan respektive vatten.

HPLC-metoden är mindre känslig än skakkolvmetoden för närvaron av orenheter i ämnet. Trots detta kan orenheter i vissa tillfällen göra det svårt att tolka resultaten eftersom toppvärden blir osäkra. För blandningar med ett oupplöst band anges en övre och nedre gräns för log P.

1.2 DEFINITIONER OCH ENHETER

Fördelningskoefficienten (P) definieras som förhållandet mellan jämviktskoncentrationerna (c_i) för ett ämne som lösts i ett tvåfassystem bestående av två i stort sett icke blandbara lösningsmedel. För n-oktansyra och vatten är

$$p_{ow} = \frac{c_{n-octanol}}{c_{water}}$$

Fördelningskoefficienten (P) är således ett förhållande mellan två koncentrationer och uttrycks vanligtvis i form av dess logaritm för basen 10 (log P).

▼B

1.3 REFERENSÄMNEN

Skakkolvmetoden

Man behöver inte använda referensämnen varje gång ett nytt ämne ska undersökas. Referensämnen ska först och främst användas för att då och då kontrollera metoden och för jämförelse med resultat som uppnåtts med andra metoder.

HPLC-metoden

För att kunna korrelera uppmätta HPLC-data för ett ämne med dess P-värde måste en kalibreringskurva för log P mot kromatografiska data fastställas med användning av minst 6 referenspunkter. Det är upp till användaren att välja lämpliga referensämnen. När så är möjligt ska minst ett referensämne ha en P_{ow}-värde som ligger över testämnets, och minst ett med ett P_{ow}-värde under testämnets. För värden av log P under 4 kan kalibreringen baseras på data som erhållits genom skakkolvmetoden. För värden av log P över 4 kan kalibreringen baseras på validerade hänvisningsvärden om dessa motsvarar beräknade värden. För bättre noggrannhet är det att föredra att välja referensämnen som strukturmässigt liknar testämnet.

Det finns omfattande listor av värden av log P_{ow} för många grupper av kemikalier (se hänvisningar 2 och 3). Om det inte finns data om fördelningskoefficienter för strukturmässigt besläktade ämnen kan en mer allmän kalibrering, upprättad med andra referensföreningar, användas.

I tillägg 2 finns en lista med rekommenderade referensämnen och deras P_{ow}-värden.

1.4 TESTMETODSPRINCIPER

1.4.1 **Skakkolvmetoden**

För att kunna bestämma fördelningskoefficienten måste jämvikt uppnås mellan alla samverkande komponenter i systemet, och koncentrationerna av de ämnen som lösts i de två faserna måste bestämmas. En genomgång av litteraturen i detta ämne visar att man kan använda flera olika tekniker för att lösa detta problem, dvs. noggrann blandning av två faserna för bestämning av det undersökta ämnets jämviktskoncentration efter separation av faserna.

1.4.2 **HPLC-metoden**

HPLC utförs på analytiska kolonner packade med en kommersiellt tillgänglig fast fas innehållande långa kedjor av kolväte (t.ex. C_8, C_{18}) kemiskt bundna till kisel. Om kemikalier insprutas på en sådan kolonn kommer de att vandra genom den med olika hastigheter, eftersom deras fördelning mellan den mobila och den stationära fasen inte är densamma. Kemikalieblandningar elueras i ordningsföljd efter hydrofobicitet, varvid de vattenlösliga kemikalierna elueras först och de oljeupplösliga sist, i proportion till deras kolväte-/vattenfördelningskoefficient. Därefter kan sammanhanget mellan retentionstiden på en sådan kolonn (med omvänd fas) och n-oktan/vattenfördelningskoefficienten fastställas. Fördelningskoefficienten utleds av kapacitetsfaktorn k, som fås genom

▼B

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

där t_R är testämnets retentionstid och t_o den genomsnittliga tid det tar för en lösningsmedelsmolekyl att komma igenom kolonnen (kolonnens dödtid).

Det krävs inga kvantitativa analysmetoder och det är endast nödvändigt att bestämma retentionstiden.

1.5 KVALITETSKRITERIER

1.5.1 **Repeterbarhet**

Skakkolvmetoden

För att säkerställa en exakt fördelningskoefficient ska dubbla bestämningar göras under tre olika testbetingelser, varvid såväl mängden av det angivna ämnet som förhållandet mellan lösningsmedlens volymer kan varieras. Bestämningen av fördelningskoefficientens värden uttryckta som deras allmänna logaritmer ska ligga inom ±0,3 logaritmenheter.

HPCL-metoden

För att öka tilltron till mätningen görs dubbla bestämningar. Värdena av log P beräknade på grundval av de individuella mätningarna ska ligga inom ett intervall av ±0,1.

1.5.2 **Sensitivitet**

Skakkolvmetoden

Metodens mätområde bestäms av analysförfarandets detektionsgräns. Denna bör vara tillräcklig för att medge bestämning av värden för log P_{ow} i området - 2 till 4 (under vissa omständigheter kan detta område ökas till log P_{ow} upp till 5) när koncentrationen av det lösta ämnet i endera fasen inte är större än 0,01 mol per liter.

HPLC-metoden

Med HPLC-metoden kan man uppskatta fördelningskoefficienter i log P_{ow}-området från 0 till 6.

Normalt kan en förenings fördelningskoefficient uppskattas med en avvikelse av mindre än ± 1 från det värde som uppnås med skakkolvmetoden. Typiska korrelationer framgår i hänvisningarna (4, 5, 6, 7 och 8). Man upnår normalt större noggrannhet om man använder korrelationskurvor baserade på strukturmässigt besläktade referensämnen {se hänvisning 9).

▼B

1.5.3 **Specificitet**

Skakkolvmetoden

Nernsts fördelningslag gäller endast för utspädda lösningar vid konstant temperatur, tryck och pH-värde. Den gäller endast för ett rent ämne som fördelats mellan två rena lösningsmedel. Om flera olika lösta ämnen förekommer i den ena eller i båda faserna samtidigt, kan detta påverka resultaten.

Dissociation eller association av de lösta molekylerna resulterar i avvikelser från Nernsts fördelningslag. Sådana avvikelser framgår av det faktum att fördelningskoefficienten blir beroende av lösningens koncentration.

På grund av de många inblandade jämvikterna ska denna metod inte användas på joniserbara föreningar utan korrektion. För sådana föreningar kan man överväga att använda buffertlösningar i stället för vatten. I så fall ska buffertlösningens pH-värde ligga minst 1 enhet från ämnets pKa och detta pH-värdes inverkan på miljön ska beaktas.

1.6 METODBESKRIVNING

1.6.1 **Preliminär uppskattning av fördelningskoefficienten.**

Fördelningskoefficientens värde kan företrädesvis uppskattas genom en enkel beräkning (se tillägg 1) eller, vid behov, på grundval av testämnenas löslighet i de rena lösningsmedlen (se hänvisning 10).

1.6.2 **Skakkolvmetoden**

1.6.2.1 *Förberedelser*

n-oktansyra: Fördelningskoefficienten ska bestämmas med användning av reagenser med mycket hög analytisk renhetsgrad.

Vatten: Destillerat eller omdestillerat vatten från glas- eller kvartsapparat ska användas. För joniserbara föreningar används buffertlösmngar i stället för vatten, om detta är motiverat.

Anmärkning:

Vatten som hämtats direkt från en jonbytare får inte användas.

1.6.2.1.1 Förmättnad av lösningsmedlen

Innan en fördelningskoefficient bestäms mättas var och en av de faser som ingår i lösningsmedelssystemet ömsesidigt genom omskakning vid testtemperatur. För detta är det praktiskt att använda en mekanisk skakapparat, och låta den i 24 timmar skaka två stora stamkolvar med n-oktansyra med mycket hög analytisk renhetsgrad eller vatten, vardera innehållande tillräcklig mängd av det andra lösningsmedlet, varefter flaskorna får stå tillräckligt länge för att medge separation av faserna och för att uppnå ett mättnadstillstånd.

▼B

1.6.2.1.2 Testförberedelse

Testkärlet ska vara nästan helt fyllt av tvåfassystemet. Detta förhindrar materialförlust till följd av avdunstning. Förhållandet mellan volym och mängder ämne fastställs på grundval av följande:

— Den preliminära uppskattningen av fördelningskoefficienten (se ovan).

— Den minsta mängden testämne som behövs för analysförfarandet.

— Begränsningen av en högsta koncentration i endera fasen på 0,01 mol per liter.

Tre test ska göras. I det första tillsätts det beräknade volymförhållandet av n-oktansyra till vatten; i det andra tillsätts dubbla volymen n-oktansyra; och i det tredje tillsätts halva volymen n-oktansyra (dvs. 1:1, 1:2, 2:1).

1.6.2.1.3 Testämne

En stamlösning framställs i n-oktansyra förmättad med vatten. Innan stamlösningen används för bestämning av fördelningskoefficienten ska dess faktiska koncentration bestämmas exakt. Denna lösning ska förvaras under stabila betingelser.

1.6.2.2 *Testbetingelser*

Testtemperaturen ska hållas konstant (± 1 °C) och ligga i området 20–25 °C.

1.6.2.3 *Mätförfarande*

1.6.2.3.1 Uppnående a v fördelningsjämvikt

För varje testbetingelse används två testkärl som vart och ett innehåller erforderliga, exakt mätta mängder av de två lösningsmedlen och den erforderliga mängden stamlösning.

Delarna n-oktansyra ska mätas per volym. Testkärlen ska antingen placeras i en lämplig skakapparat eller skakas för hand. Nar ett centrifugeringsglas används rekommenderas att snabbt vrida centrifugglaset 180° kring dess tväraxel så att all instängd luft stiger upp genom de två faserna. Erfarenheten visar att 50 sådana vridningar normalt är tillräckligt för att erhålla fördelningsjämvikt. För att vara säker på detta rekommenderas 100 vridningar under fem minuter.

1.6.2.3.2 Fasseparation

Vid behov kan blandningen centrifugeras för att separera faserna. Detta görs i en laboratoriecentrifug som hålls vid rumstemperatur, eller, om en centrifug utan temperaturreglering används, ska centrifugglasen minst en timme före analysen bringas i jämvikt med testtemperaturen.

▼B

1.6.2.4 *Analys*

För bestämningen av fördelningskoefficienten är det nödvändigt att bestämma koncentrationerna av testämnet i båda faserna. Detta kan man göra genom att för varje testbetingelse ta ett delprov av varje fas från varje glas och analysera dessa enligt det valda förfarandet. Den totala mängden ämne i båda faserna beräknas och jämförs med den mängd ämne som ursprungligen tillsattes.

Proven från vattenfasen ska tas på så sätt att risken att den innehåller spår av n-oktansyra minimeras: en glasspruta med avtagbar kanyl kan användas till att ta prov från vattenfasen. Sprutan ska först fyllas delvis med luft. Luften ska försiktigt pressas ut medan kanylen förs genom n-oktansyrafasen. En lämplig volym av vattenfasen dras upp i sprutan. Sprutan dras snabbt bort från lösningen och kanylen avlägsnas. Innehållet i sprutan kan sedan användas som vattenprovet. Koncentrationen i de två separerade faserna ska helst bestämmas med en ämnesspecifik metod. Exempel på fysisk-kemiska bestämningar som kan vara lämpliga är

— fotometriska metoder,

— gaskromatografi,

— högpresterande vätskekromatografi (HPLC).

1.6.3 **HPLC-metoden**

1.6.3.1 *Förberedelser*

Apparatur

Det krävs en vätskekromatograf med pulsfri pump och passande detektionssystem. Användning av insprutningsventil med insprutningsspole rekommenderas. Närvaro av polära grupper i den stationära fasen kan väsentligt nedsätta HPLC-kolonnernas prestation. Till följd av detta måste de stationära faserna ha lägsta möjliga procentuella innehåll av polära grupper (se hänvisning 11). Ett kommersiellt mikroniserat fyllningsmaterial med omvänd fas eller färdigfyllda kolonner kan användas. Eventuellt kan en förkolonn placeras mellan insprutnings-systemet och den analyskolonnen.

Mobil fas

Metanol och vatten av HPLC-kvalitet används för att framställa elueringsvätskan, vilken avgasas innan användning. Isokratisk eluering används. Den använda metanol/vattenblandningen ska innehålla minst 25 % vatten. För eluering av föreningar med ett log P av 6 på en timme med en flödeshastighet av 1 ml/m räcker det vanligtvis med en blandning av metanol och vatten i förhållandet 3:1 (v/v). För föreningar med ett högt log P-värde kan det vara nödvändigt att minska elueringstiden (även för referensämnena) genom att utnyttja en mindre polär mobil fas eller en kortare kolonn.

Ämnen med mycket låg löslighet i n-oktan har en tendens att ge onormalt låga värden för log P_{ow} med HPLC-metoden. Ibland följer sådana föreningars toppar lösningsmedelsfronten. Detta beror sannolikt på att fördelningsprocessen är för långsam för att jämvikt ska kunna uppnås inom tiden för en HPLC-separation. I detta fall kan en minskning av flödeshastigheten och/eller en minskning av metanol/vattenförhållandet vara effektivt för att erhålla ett pålitligt värde.

▼B

Både testämnet och referensämnen ska vara lösliga i den mobila fasen i en så hög koncentration att detta kan påvisas. Endast i undantagsfall får tillsättningsämnen användas till metanol/vattenblandningen, eftersom tillsättningsämnen kommer att ändra kolonnens egenskaper. För kromatografer med tillsättningsämnen ska man alltid använda en separat kolonn av samma slag. Om metanol/vatten inte är lämpligt kan man använda andra blandningar av vatten och organiska lösningsmedel, t.ex. etanol/vatten eller acetonitril/vatten.

För joniserbara ämnen är elueringsvätskans pH-värde kritiskt. Det ska ligga innanför kolonnens driftsområde, vilket normalt är från 2 till 8. Användning av buffert rekommenderas. Det är viktigt att undvika saltutfällning och försämring av kolonnen, vilket kan förekomma med vissa blandningar av organisk fas och buffert. HPLC-mätningar med kiselbaserade faser med pH över 8 rekommenderas inte eftersom alkalisk mobil fas kan leda till att kolonnens prestation hastigt försämras.

Lösningar

Referensämnen ska vara av renast möjliga kvalitet. För testning och kalibrering ska ämnena om möjligt lösas i den mobila fasen.

Försöksbetingelser

Temperaturen under mätningarna bör inte variera med mer än 2 K.

1.6.3.2 **Mätningar**

Beräkning av dödtiden t_0

Dödtiden t_0 kan bestämmas antingen med en homolog serie (t.ex. n-alkylmetylketoner) eller med organiska ämnen som inte hålls kvar (t.ex. thiourea eller formamid). För att beräkna dödtiden t_0 pä grundval av en homolog serie insprutas minst sju element av en homolog serie, och retentionstiderna bestäms. Bruttoretentionstiderna $t_r(n_c+1)$ avbildas mot $t_r(n_c)$, och i regressionsekvationen

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

bestäms avskärningen a och hållningskoefficienten b (n_c = antalet kolatomer). Dödtiden ges då genom

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

▼B

Kalibreringskurva

Nästa steg består i att konstruera en korrelationskurva av log k mot log P för passande referensämnen. I praktiken insprutas det samtidigt mellan fem och tio standardreferensämnen, om log P ligger i det förväntade området, och retentionstiderna bestäms, helst med en integrationsskrivare som är kopplad till detektionssystemet. Motsvarande logaritmer för kapacitetsfaktorerna, log k, beräknas och avsätts mot den log P som är bestämd genom skakkolvmetoden. Kalibreringen företas regelbundet, minst en gång om dagen, för att ta hänsyn till för eventuella ändringar i kolonnens prestation.

Bestämning av testämnets kapacitetsfaktor

Testämnet sprutas in som en så liten mängd mobil fas som möjligt. Retentionstiden bestäms (dubbla bestämningar), varefter kapacitetsfaktorn k kan beräknas. På grundval av korrelationskurvan över referensämnena kan testämnets fördelningskoefficient interpoleras. Vid mycket låga och mycket höga fördelningskoefficienter är det nödvändigt att extrapolera. I sådana fall måste man vara särskilt uppmärksam på regressionslinjens konfidens-gränser.

2. **DATA**

Skakkolvmetoden

Tillförlitligheten av de bestämda P-värdena kan prövas genom en jämförelse mellan medelvärdena för de dubbla bestämningarna och det totala medelvärdet.

3. **RAPPORTERING**

Testrapporten ska om möjligt innehålla följande uppgifter:

— Exakt specificering av ämnet (beteckning och orenheter).

— Om metoderna inte kan användas (t.ex. ytaktiva material), en beräknat värde eller en uppskattning på grundval av individuella n-oktan och vattenlöslighet.

— Alla uppgifter och upplysningar av betydelse för tolkningen av resultaten, särskild i fråga om orenheter i ämnet och ämnets fysiska tillstånd.

För skakkolvmetoden:

— Resultatet från en eventuell preliminär uppskattning.

— Temperatur vid bestämningen.

— Data om de analysförfaranden som används vid bestämning av koncentrationerna.

— Eventuell centrifugeringstid och -hastighet.

▼B

— De mätta koncentrationerna i båda faserna för varje bestämning. (Detta innebär att totalt 12 koncentrationer ska anges.)

— Vikten på testämnet, den använda volymen av varje fas i varje testkärl och den totala beräknade mängden testämne som finns i varje fas efter uppnående av jämvikt.

— De beräknade värdena för fördelningskoefficienten (P) och medelvärdet för varje uppsättning testbetingelser, liksom medelvärdet för alla bestämningar. Eventuella tecken på att fördelningskoefficienten är koncentrationsberoende ska anges i rapporten.

— De enskilda P-värdenas standardavvikelse från genomsnittet.

— Genomsnittsvärdet för P från alla bestämningar anges också som dess logaritm (bas 10).

— Det beräknade teoretiska värdet av P_{ow}, när detta värde är bestämt eller när det mätta värdet är > 10^4.

— pH-värdet i vattnet som har använts och i vattenfasen under testet.

— Motivering för användning av buffertlösningar i stället för vatten, deras sammansättning, koncentration och pH-värde samt vattenfasens pH-värde före och efter testet.

För HPLC-metoden:

— Resultatet av en eventuell preliminär uppskattning.

— Test- och referensämnen, och deras renhetsgrad.

— Temperaturområde vid bestämningen.

— Det pH-värde vid vilket bestämningarna gjorts.

— Detaljerade uppgifter om analys- och förkolonn, rörlig fas och detektionssystem.

— Retentionsdata och hänvisningsvärden för log P för referensämnen som använts vid kalibrering.

— Detaljerade uppgifter om anpassning av retentionslinjen (log k mot log P).

— Genomsnittliga retentionsdata och interpolerat log P-värde för testämnet.

— Beskrivning av utrustning och driftsbetingelser.

— Elueringsprofiler.

— Den mängd test- och referensämne som tillförts kolonnen.

— Dödtiden och hur den är uppmätt.

▼B

4. **HÄNVISNINGAR**

1. OECD, Paris, 1981, Test Guideline 107, rådets beslut K(81) 30 slutligt.

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

3. Log P and Parameter Database, A took for the quantitative prediction of bioactivity (C. Hasch, chairman, A. J. Leo, dir.) – Tillgänglig från Pomona College Medical Chemistry Project 1982, Pornona College, Claremont, California 91711.

4. L. Renberg, G. Sundström och K. Sundh-Nygård, Chemosphere, 1980, vol. 80, s. 683.

5. H. Ellgehausen, C. D'Hondt och R. Fuerer, Pestic. Sci., 1981, vol, 12, s. 219.

6. B. McDuffie, Chemosphere, 1981, vol. 10, s. 73.

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

8. J. E. Haky och A. M. Youg, J. Liq. Chromat., 1984, vol. 7, s. 675.

9. S. Fujisawa och E. Masuhara, J. Biomed. Mat. Res., 1981, vol. 15, s. 787.

10. O. Jubermann, Verteilen und Extrahieren, in Methoden der Organischen Chemie (Houben Weyl), Allgemeine Laboratoriumpraxis (editerad av E. Muller), Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1958, band I/l, s. 223–339.

11. R. F. Rekker och H. M. de Kort, Euro. J. Med. Chem,. 1979, vol. 14., s. 479.

12. A. Leo, C. Hansch och D. Elkins, artition coefficients and their uses. Chem. Rev. 1971, vol. 71, s. 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 shake method.

15. C. V. Eadsforth och P. Moser, Chemosphere, 1983, vol. 12, s. 1459.

16. A. Leo, C. Hansch och D. Elkins, Chem. Rev., 1971, vol. 71, s. 525.

17. C. Hansch, A. Leo, S. H. Unger, K. H. Dim, D. Nikaitani och E. J. Lien, J. Med. Chem, 1973, vol. 16, s. 1207.

18. W. B. Neely, D. R. Branson och G. E. Blau, Environ. Sci. Technol., 1974, vol. 8, s. 1113.

19. D. S. Brown och E. W. Flagg, J. Environ. Qual., 1981, vol. 10, s. 382.

20. J. K. Seydel och K. J. Schaper, Chemische Struktur und biologische Aktivität von Wirkstoffen, Verlag Chemiw, 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, Basel, 1978.

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

▼B

Tillägg 1

Metoder för beräkning/uppskattning

INLEDNING

I Handbook of Chemical Property Estimation Methods finns en allmän introduktion till beräkningsmetoder, data och exempel (se hänvisning a).

Beräknade värden av P_{ow} kan användas

— för att bestämma vilken testmetod som är lämplig (skakkolvområde: log P_{ow}: 2 till 4, HPLC-område: log P_{ow}: 0 till 6),

— för val av lämpliga testbetingelser (t.ex. referensämnen för HPLC-förfaranden, volymratio n-oktanol/vatten för skakkolvmetoden),

— som en intern laboratoriekontroll vid eventuella försöksfel,

— för att få en uppskattning av P_{ow} i fall där testmetoderna inte kan tillämpas av tekniska skäl.

UPPSKATTNINGSMETOD

Preliminär uppskattning av fördelningskoefficient.

Fördelningskoefficientens värde kan uppskattas med hjälp av testsubstansens löslighet i rena lösningsmedel. För detta används:

$$P_{\text{uppskattning}} = \frac{\text{mättnad } c_{\text{n – octanol}}}{\text{mättnad } c_{\text{vatten}}}$$

BERÄKNINGSMETODER

Principen för beräkningsmetoderna

Alla beräkningsmetoder är baserade på formell fragmentering av molekylen i lämpliga understrukturer för vilka man har pålitlig kännedom om log P_{ow}-inkrementer. Log P_{ow} för hela molekylen beräknas sedan som summan av dess motsvarande fragmentvärden plus summan av korrektionsuttrycken för intramolekylär växelverkan.

En lista med fragmentkonstanter och korrektionsuttryck finns i hänvisningarna b, c, d och e. Vissa av dem uppdateras regelbundet (hänvisning b).

Kvalitetskriteria

Normalt avtar beräkningsmetodens pålitlighet i takt med komplexiteten hos den testade föreningen. För enkla molekyler med låg molekylvikt och en eller två funktionsgrupper kan en avvikelse av 0,1 till 0,3 förväntas mellan resultatet av olika fragmenteringsmetoder och det mätta värdet för log P_{ow}. Felmarginalen kan vara ännu större för mer komplexa molekyler. Detta beror på pålitligheten och förekomsten av fragmentkonstanter, liksom möjligheten att känna igen intramolekylära växelverkningar (t.ex. väteförbindelser) och om korrektionstermen används korrekt (detta är inte ett lika stort problem med programvaran CLOGP-3). I fråga om joniserbara föreningar är det av stor betydelse att laddningen eller joniseringsgraden bedöms korrekt.

▼B

Beräkningsmetoder

Hansch Π-metoden

Den ursprungliga konstanten för hydrofoba substituenter, π, som införts av Fujita m.fl. (se hänvisning f) definieras genom

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

I enlighet med dess definition är -metoden lämplig för aromatisk substitution. Det finns tabeller med -värden för ett stort antal substitutioner (se hänvisningar b, c och d). De används för beräkning av log P_{ow} för aromatiska molekyler och understrukturer.

(e.g. π_{Cl} = log P_{ow} (C_6H_5Cl) - log P_{ow} (C_6H_6) = 2,84 - 2,13 = 0,71).

där Pow (PhX) är fördelningskoefficienten av ett aromatiskt derivat och Pow (PhH) är moderföreningens fördelningskoefficient

Rekkers metod

I enlighet med Rekker (se hänvisning g) beräknas värdet av log P_{ow} på följande sätt:

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

där f_i representerar olika molekylfragmentkonstanter och a_i är den frekvens med vilken de förekommer i den molekyl som testas. Korrektionstermerna kan uttryckas som en integral multipel av en enda konstant C_m (den s.k. magiska konstanten). Fragmentkonstanterna f_i ch C_m bestäms på grundval av en tabell med 1 054 experimentellt bestämda värden av P_{ow} (825 föreningar) med användning av flerdimensionell regressionsanalys (se hänvisningar c och h). Växelverkningsuttrycken bestäms efter fastställda regler som beskrivs i hänvisningslitteraturen (se hänvisningar e, h och i).

Hansch-Leos metod

I enlighet med Hansch och Leo (se hänvisning c) beräknas värden av log P_{ow} på följande sätt:

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

där f_i representerar de olika molekylfragmentkonstanterna, F_i är korrektionsuttrycken och a_i och b_j är de motsvarande uppträdandefrekvenserna. På grundval av experimentellt bestämda värden av P_{ow} har man genom att prova sig fram kunnat ställa upp en lista över atom- och gruppfragmentvärden och en lista över korrektionsuttryck F_j (s.k. faktorer). Korrektionsuttrycken har delats in i olika klasser (se hänvisningar a och c). Det är relativt komplicerat och tidsödande att ta hänsyn till alla regler och korrektionsuttryck. Programvarupaket har utvecklats för detta (se hänvisning b).

Kombinerad metod

Beräkningen av log P_{ow} för komplexa molekyler kan förbättras betydligt om molekylen delas upp i större delstrukturer för vilka pålitliga log P_{ow}-värden finns tillgängliga, antingen från tabeller (se hänvisningar b och c) eller från egna mätningar. Sådana fragment (t.ex. heterocykler, anthraquinon, azobensen) kan sedan kombineras med Hanschs Π-värden eller med Rekkers eller Leos fragmentkonstanter.

Anmärkningar

i) Beräkningsmetoderna kan endast användas på helt eller delvis joniserade föreningar om det är möjligt att beakta de nödvändiga korrektionsfaktorerna.

▼B

ii) Om intramolekylära väteförbindelser kan antas förekomma måste motsvarande korrektionstermer (ca +0,6 till +1,0 log P_{ow}-enheter) läggas till (se hänvisning a). Indikationer av närvaron av sådana förbindelser kan erhållas från stereomodeller eller spektroskopiska data av molekylen.

iii) Om flera tautomeriska former är möjliga används den mest sannolika formen som bas för beräkningen.

iv) Revisioner av listor med fragmentkonstanter ska följas noggrant.

Rapportering

Vid användning av beräknings-/uppskattningsmetoder ska testrapporten om möjligt innehålla följande information:

— Beskrivning av ämnet (blandning, orenheter etc).

— Indikation av eventuella intramolekylära väteförbindelser, dissociation, laddning och andra eventuella särskilda förhållanden (t.ex. tautomeri).

— Beskrivning av beräkningsmetoden.

— Identifiering eller tillhandahållande av databas.

— Särskilda val av fragment.

— Fullständig dokumentation av beräkningen.

HÄNVISNINGAR

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

2. Pomona College, Medicinal Chemistry Project, Claremont, California 92711, USA, Log P Database och Med. Chem. Software (Program CLOGP - 3).

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

4. A. Leo, C. Hansch, D. Elkins, Chem. Rev, 1971, vol. 71, s. 525.

5. R. F. Rekker och H. M. de Kort, Euro. J. Med. Chem,. 1979, vol. 14, s. 479.

6. 6. T. Fujita, J. Iwasa och C. Hansch, J. Amer. Chem. Soc, 1964, vol. 86, s. 5175.

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

8. C. V. Eadsforth, P. Moser, Chemosphere, 1983, vol. 12, s. 1459.

9. R. A. Scherrer, ACS, American Chemical Sociery, Washington D. C, 19S4, Symposium Senes 255, s. 225.

▼B

Tillägg 2

Rekommenderade referensämnen för HPLC-metoden

Nr	Referensämne	Log P_{ow}	pKa
1	2-butanon	0,3	
2	4-acetylpyndin	0,5	
3	Anilin	0,9	
4	Acetanilid	1,0	
5	Bensylalkohol	1,1	
6	p meloxilenol	1,3	pKa = 10,26
7	Fenoxyättiksyra	1,4	pKa = 3,12
8	Fenol	1,5	pKa = 9,92
9	2,4-dinitrofenol	1,5	pKa = 3,96
10	Bensonitril	1,6	
11	Fenylättiknitril	1,6	
12	4-metylbensenalkohol	1,6	
13	Acetonfenon	1,7	
14	2-nitrofenol	1,8	pKa = 7,17
15	3-nitrobcnsoesyra	1,8	pKa = 3,47
16	4-kloranilin	1,8	pKa = 4,15
17	Nitrobensen	1,9	
18	Kanelalkohol	1,9	
19	Bensoesyra	1,9	pKa = 4,19
20	p-kresol	1,9	pKa = 10,17
21	Kanelsyra	2,1	pKa = 3,89 cis 4,44 träns
22	Anisol	2,1	
23	Metylbensoat	2,1	
24	Bensen	2,1	
25	3-metylbensoesyra	2,4	pKa = 4,27
26	4-klorfenol	2,4	pKa = 9,1
27	Trikloretylen	2,4	
28	Atrazin	2,6	
29	Etylbensoat	2,6	
30	2,6-diklorbensonitril	2,6	
31	3-klorbensoesyra	2,7	pKa = 3,82
32	Toluen	2,7	
33	1-naftol	2,7	pKa = 9,34
34	2,3-dikloranilin	2,8	
35	Monoklorbensen	2,8	
36	Allyl-fenyleter	2,9	
37	Bromobensen	3,0	

▼B

Nr	Referensämne	Log P_{ow}	pKa
38	Etylbensen	3,2	
39	Bensofenon	3,2	
40	4-fenylfenol	3,2	pKa = 9,54
41	Tymol	3,3	
42	1,4-diklorbensen	3,4	
43	Difenylamin	3,4	pKa = 0,79
44	Naftalen	3,6	
45	Fenylbensoat	3,6	
46	Isopropylbensen	3,7	
47	2,4,6-triklorfenol	3,7	$_{P}$Ka = 6
48	Bifenyl	4,0	
49	Bensylbensoat	4,0	
50	2,4-dinitro-6 sec. butylfenol	4,1	
51	1,2,4-triklorbensen	4,2	
52	Dodekansyra	4,2	
53	Difenyleter	4,2	
54	n-butylbensen	4,5	
55	Fenantren	4,5	
56	Fluoranten	4,7	
57	Dibensyl	4,8	
58	2,6-difenylpyridin	4,9	
59	Tnfenylamin	5,7	
60	DDT	6,2	
	Andra referensämnen med låg log P_{ow}		
1	Nikotinsyra	- 0,07	

▼B

A.9 FLAMPUNKT

1. METOD

1.1 INLEDNING

Vid utförande av detta test är det värdefullt att ha förhandskunskap om ämnets brandfarlighet. Testförfarandet kan tillämpas på flytande ämnen vars ångor kan antändas av antändningskällor. De testmetoder som beskrivs i denna text är endast tillförlitliga för de flampunktsområden som anges för de enskilda metoderna.

Vid val av försöksmetod ska man ta hänsyn till en eventuell kemisk reaktion mellan ämnet och provbehållaren.

1.2 DEFINITIONER OCH ENHETER

Flampunkten är den lägsta temperatur, korrigerad vid ett tryck av 101,325 kPa, vid vilken testvätskan i ett slutet testkärl, under de betingelser som definieras för testmetoden, utvecklar ånga i sådan mängd att en brandfarlig ång-luftblandning bildas i testkärlet.

Enheter: ^{o}C

$t = T - 273{,}15$

(t i ^{o}C och T i K)

1.3 REFERENSÄMNEN

Man behöver inte använda referensämnen varje gång ett nytt ämne ska undersökas. Referensämnen ska först och främst användas för att då och då kontrollera metoden och för jämförelse med resultat som uppnåtts med andra metoder.

1.4 TESTMETODSPRINCIPER

Ämnet placeras i ett testkärl och värms upp eller kyls ned till testtemperaturen i enlighet med det beskrivna förfarandet för de individuella testmetoderna. Antändningsförsök utförs för att fastställa om provet antänds vid testtemperaturen.

1.5 KVALITETSKRITERIER

1.5.1 **Repeterbarhet**

Repeterbarheten varierar med flampunktsområde och använd testmetod: högst ± 2 ^{o}C.

1.5.2 **Sensitivitet**

Sensitiviteten är beroende av använd testmetod.

1.5.3 **Specificitet**

Vissa testmetoders specificitet är begränsad till vissa flampunktsområden och avhängiga av ämnesrelaterade egenskaper (t.ex. hög viskositet).

▼B

1.6 METODBESKRIVNING

1.6.1 **Förberedelser**

Ett prov av testämnet placeras i en testapparat enligt 1.6.3.1 och/eller 1.6.3.2.

Av säkerhetsskäl rekommenderas att man för energiska eller toxiska ämnen endast använder en metod med en liten provstorlek, ca 2 cm^3.

1.6.2 **Testbetingelser**

Apparaten ska, såvida detta är förenligt med säkerhetskraven, placeras fritt från drag.

1.6.3 **Testförfarande**

1.6.3.1 *Jämviktsmetoden*

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

1.6.3.2 *Icke-jämviktsmetoden*

Abel-apparat:

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

Abel-Pensky-apparat:

Se (EN 57), DIN 51755 del 1 (för temperaturer från 5 till 65 °C), DIN 51755 del 2 (för temperaturer under 5 °C), NF M07-036.

Tag-apparat:

Se ASTM D 56.

Pensky-Mårtens-apparat:

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

Anmärkningar:

Om flampunkten, bestämd med en icke-jämviktsmetod enligt 1.6.3.2, konstateras vara 0 ± 2 °C, 21 ± 2 °C eller 55 ± 2 °C, ska den bekräftas med en jämviktsmetod med samma apparat.

Endast de metoder som kan utvisa flampunktstemperaturen får användas till en anmälan.

För att bestämma flampunkten för viskösa vätskor (färger, lim och liknande) som innehåller lösningsmedel, får endast apparatur och testmetoder som lämpar sig för bestämning av flampunkten för viskösa vätskor användas.

Se ISO 3679, ISO 3680, ISO 1523, DIN 53213 del 1.

▼B

2. **DATA**

3. **RAPPORTERING**

Testrapporten ska, om möjligt, innehålla följande uppgifter:

— Exakt specificering av ämnet (beteckning och orenheter).

— Den använda metoden ska anges liksom eventuella avvikelser.

— Resultaten och kompletterande uppgifter av betydelse för tolkningen av resultaten.

4. **HÄNVISNINGAR**

Inga.

▼B

A.10 ANTÄNDLIGHET (FASTA ÄMNEN)

1. METOD

1.1 INLEDNING

Vid utförande av detta test är det värdefullt att ha förhandskunskap om ämnets eventuella explosiva egenskaper. Testet utförs endast på pulverformiga, granulära och pastaaktiga ämnen.

För att inte ta med alla ämnen som kan antändas, utan endast de som brinner snabbt eller de som på ett eller annat sätt har särskilt farliga egenskaper vid förbränning, anses endast de ämnen vars förbränningshastighet överstiger ett visst gränsvärde vara lättantändliga.

Det kan vara särskilt farligt om glödningen fortsätter genom metallpulver eftersom en brand är mycket svår att släcka.

Metallpulver anses lättantändliga om glödningen kan breda ut sig i provet inom en viss tid.

1.2 DEFINITIONER OCH ENHETER

Förbränningstiden uttrycks i sekunder.

1.3 REFERENSÄMNEN

Inte angivna.

1.4 TESTMETODSPRINCIP

Ämnet formas till ett 250 mm långt obrutet band och det företas ett preliminärt screeningtest för att bestämma om det, efter antändning med en gaslåga, sker en förbränning som breder ut sig med öppen låga eller genom glödning. Om glödningen breder ut sig mer än 200 mm av bandet inom en bestämd tid ska ett fullständigt testprogram utföras för bestämning av förbränningshastigheten.

1.5 KVALITETSKRITERIER

Inte angivna.

▼B

1.6 METODBESKRIVNING

1.6.1 **Preliminärt screeningtest**

Ämnet formas till ett obrutet band som är omkring 250 mm långt, 20 mm brett och 10 mm högt på en ickebrännbar, icke-porös dåligt värmeledande plats. En gaslåga (minsta diameter 5 mm) hålls vid den ena änden av pulverbandet tills pulvret fattar eld, dock högst 2 minuter (5 minuter för metallpulver och metallegeringar). Man noterar om förbränningen breder ut sig 200 mm över bandet under testperiodens 4 minuter (40 minuter för metallpulver). Om ämnet inte fattar eld eller förbränning med öppen låga eller genom glödning inte breder ut sig 200 mm över bandet under testperiodens 4 minuter (40 minuter) anses ämnet inte vara lättantändligt och ytterligare försök är inte nödvändiga. Om förbränningen i ämnet breder ut sig 200 mm över bandet på mindre än 4 minuter eller mindre än 40 minuter för metallpulver utförs nedanstående test (1.6.2).

1.6.2 **Test för förbränningshastighet**

1.6.2.1 *Förberedelse*

Pulverformiga eller granulära ämnen fylls löst packat i en form som har en längd av 250 mm och en triangelformad tvärsnittssektion med en invändig höjd av 10 mm och en invändig bredd av 20 mm. På ömse sidor om formen monteras i längdriktningen en sidoavgränsande metallplatta, som skjuter ut 2 mm ovanför den triangelformade tvärsnittssektionen (se figuren). Därefter låter man formen falla tre gånger från 2 cm höjd på ett fast underlag. Om så behövs fylls formen på igen. Därefter tas de sidoavgränsande metallplattorna bort och överskottsämne skrapas bort. En icke-brännbar, icke-porös dåligt värmeledande platta läggs över formen, apparaten vänds upp och ned och formen avlägsnas.

Pastaaktiga ämnen breds ut på en icke-brännbar, icke-porös dåligt värmeledande platta som en 250 mm lång korv med ett tvärsnitt av ungefär 1 cm^2.

1.6.2.2 *Testbetingelser*

Om ämnet är fuktkänsligt ska testet utföras så snabbt som möjligt efter det att ämnet har avlägsnats från behållaren.

1.6.2.3 *Testförfarande*

Anordna testhögen längs draget i ett dragskåp.

Luftdraget ska vara tillräckligt för att förhindra rök från att ta sig in i laboratoriet och ska inte ändras under testet. Ett dragskydd bör ställas upp runt apparaten.

En het flamma från en gasbrännare (minsta diameter 5 mm) används för att antända ena änden av högen.

▼B

När 80 mm av högen har bränts ska förbränningshastigheten över de nästa 100 mm mätas. Testet ska utföras sex gånger, varje gång på ett rent kallt underlag, såvida inte ett positivt resultat erhållits tidigare.

2. **DATA**

Bränntiden från det preliminära screeningtestet (1.6.1) och den kortaste förbränningstiden som bestämts i upp till sex test (1.6.2.3) är nödvändiga för utvärderingen.

3. **RAPPORTERING**

3.1 TESTRAPPORT

Testrapporten ska om möjligt innehålla minst följande uppgifter:

— Exakt specificering av ämnet (identifiering och orenheter).

— En beskrivning av ämnet som ska undersökas, dess fysiska tillstånd, inklusive fukthalt.

— Resultat från det preliminära screeningtestet och från test av brännhastighet om sådant utförts.

— Alla ytterligare upplysningar som är av betydelse för tolkningen av resultaten.

3.2 TOLKNING AV RESULTATEN

Pulverformiga, granulära eller pastaaktiga ämnen ska anses vara mycket brandfarliga om bränntiden vid en av testerna, som utförts enligt det i 1.6 beskrivna testförfarandet, är kortare än 45 sekunder. Metallpulver eller metallegeringar anses mycket lättantändliga om de kan antändas och lågan eller reaktionszonen breder ut sig över hela provet inom 10 minuter.

4. **HÄNVISNINGAR**

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

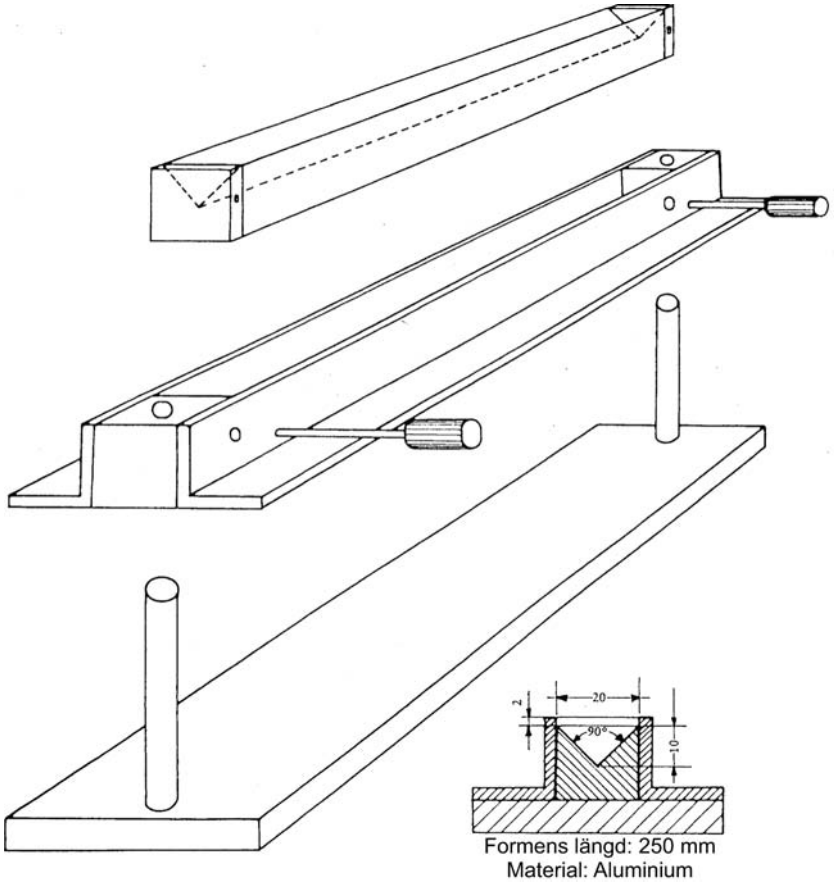
▼B

Tillägg

Figur

Form och tillbehör för anordning av testhögen

(Alla mått i mm)



▼B

A.11 ANTÄNDLIGHET (GASER)

1. METOD

1.1 INLEDNING

Denna metod gör det möjligt att bestämma om en gas blandad med luft vid rumstemperatur (cirka 20 °C) och atmosfäriskt tryck kan antändas och i så fall i vilket koncentrationsområde. Blandningar med ökande koncentrationer av testgasen i luft utsätts för en elektrisk gnista varvid iakttas om antändning sker.

1.2 DEFINITIONER OCH ENHETER

Området för antändlighet är koncentrationsområdet mellan den nedre och övre explosionsgränsen. De nedre och övre explosionsgränserna är de koncentrationsgränser för den brandfarliga gasen i en blandning med luft vid vilken en flamma inte breder ut sig.

1.3 REFERENSÄMNEN

Inte angivet.

1.4 TESTMETODSPRINCIP

Koncentrationen av gasen i luft ökas stegvis och för varje steg utsätts blandningen för en elektrisk gnista.

1.5 KVALITETSKRITERIER

Inte angivna.

1.6 METODBESKRIVNING

1.6.1 **Apparatur**

Testkärlet består av en upprättstående glascylinder med en inre diameter på minst 50 mm och en höjd på minst 300 mm. Antändningselektroderna är placerade 3–5 mm från varandra och 60 mm ovanför cylinderns botten. Cylindern är utrustad med en tryckutlösningsöppning. Apparaten ska avskärmas för att begränsa eventuell explosionsskada.

Som antändningskälla används en stående induktionsgnista med en varaktighet på 0,5 sek. Denna gnista genereras av en högspänningstransformator med en utgångsspänning på 10–15 kV (högsta ingångseffekt 300 W). I hänvisning 2 visas ett exempel på en lämplig apparat.

1.6.2 **Testbetingelser**

Detta test ska utföras vid rumstemperatur (cirka 20 °C).

▼B

1.6.3 **Testförfarande**

Med användning av doseringspumpar införs en känd koncentration av gas i luft i glascylindern. En gnista förs genom blandningen och därvid iakttas om en flamma lösgör sig från antändningskällan och självständigt breder ut sig. Gaskoncentrationen varieras i steg på 1 % volym tills antändning sker enligt beskrivningen ovan.

Om man utifrån kännedom om gasens kemiska struktur kan förmoda att gasen inte kan antändas och att sammansättningen av den stökiometriska blandningen med luft kan beräknas, behöver man endast testa blandningar från 10 % under till 10 % över det stökiometriska blandningsförhållandet.

2. **DATA**

Förekomsten av flamutbredning är den enda datauppgiften av betydelse för bestämning av denna egenskap.

3. **RAPPORTERING**

Testrapporten ska om möjligt innehålla följande uppgifter:

— Exakt specificering av ämnet (beteckning och orenheter).

— En beskrivning av den använda apparaturen med måttangivelser.

— Temperaturen vid vilken testet gjordes.

— Undersökta koncentrationer och erhållna resultat.

— Testresultaten: inte antändlig gas eller lättantändlig gas.

— Om slutsatsen blir ”inte antändlig”, ska man ange det koncentrationsområde inom vilket provning med 1 % intervaller har skett.

— Alla uppgifter och upplysningar som är av betydelse för tolkningen av resultaten ska rapporteras.

4. **HÄNVISNINGAR**

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

2. W. Berthold, D. Conrad, T. Grewser, H. Grosse-Wortmann, T. Redeker och H. Schake. ”Entwicklung einer Standard-Apparatur zur Messung von Explosionsgrenzen”. Chem.-Ing.-Tech., 1984, vol. 56, 2, s. 126–127.

▼B

A.12 ANTÄNDLIGHET (KONTAKT MED VATTEN)

1. METOD

1.1 INLEDNING

Denna testmetod kan användas till att bestämma om ett ämne vid reaktion med vatten eller fuktig luft utvecklar farliga mängder gas som eventuellt är lättantändliga.

Testmetoden kan tillämpas på både fasta och flytande ämnen. Denna metod kan inte tillämpas på ämnen som antänds spontant i kontakt med luft.

1.2 DEFINITIONER OCH ENHETER

Lättantändliga: Ämnen som vid kontakt med vatten eller fuktig luft utvecklar lättantändliga gaser i farliga mängder med en lägsta hastighet på 1 liter/kg per timme.

1.3 TESTMETODSPRINCIP

Ämnet testas enligt det stegförfarande som beskrivs nedan. Testet kan avbrytas vid antändning. Om man vet att ämnet inte reagerar våldsamt med vatten kan man börja med steg 4 (1.3.4).

1.3.1 **Steg 1**

Testämnet placeras i ett tråg innehållande destillerat vatten vid 20 °C och därvid iakttas om den utvecklade gasen antänds eller inte.

1.3.2 **Steg 2**

Testämnet placeras på ett filtrerpapper som flyter på ytan av en skål innehållande destillerat vatten vid 20 °C, och man iakttar om den utvecklade gasen antänds eller inte. Filtrerpapperet fyller endast funktionen att hålla ämnet kvar på plats för att öka möjligheten till antändning.

1.3.3 **Steg 3**

Testämnet formas till en hög, ungefär 2 cm hög och med 3 cm diameter. Ett par droppar vatten tillförs högen och man iakttar om den utvecklade gasen antänds eller inte.

1.3.4 **Steg 4**

Testämnet blandas med destillerat vatten vid 20 °C och gasutvecklingshastigheten mäts varje timme under sju timmar. Om utvecklingshastigheten efter sju timmar är oregelbunden eller ökande ska mättiden förlängas till högst fem dagar. Testet kan avbrytas om hastigheten vid något tillfälle överstiger 1 liter/kg per timme.

▼B

1.4 REFERENSÄMNE

Inte angivet.

1.5 KVALITETSKRITERIER

Inte angivna.

1.6 METODBESKRIVNING

1.6.1 **Steg 1**

1.6.1.1 *Testbetingelser*

Testet utförs vid rumstemperatur (ca 20 °C).

1.6.1.2 *Testförfarande*

En liten mängd (ungefär 2 mm diameter) av testämnet ska placeras i ett tråg innehållande destillerat vatten. Det iakttas om a) gas utvecklas och b) om gasen antänds. Om gasen antänds behöver ämnet inte undersökas ytterligare eftersom ämnet betraktas som farligt.

1.6.2 **Steg 2**

1.6.2.1 *Apparatur*

Ett filtrerpapper placeras flytande på ytan av destillerat vatten i lämpligt kärl, t.ex. en avdunstningsskål med 100 mm diameter.

1.6.2.2 *Testbetingelser*

Testet utförs vid rumstemperatur (ca 20 °C).

1.6.2.3 *Testförfarande*

En liten mängd av testämnet (ungefär 2 mm diameter) placeras i mitten av ett filtrerpapper. Det iakttas om a) gas utvecklas och b) om gasen antänds. Om gasen antänds behöver ämnet inte undersökas ytterligare eftersom ämnet betraktas som farligt.

1.6.3 **Steg 3**

1.6.3.1 *Testbetingelser*

Testet utförs vid rumstemperatur.

1.6.3.2 *Testförfarande*

Testämnet formas till en hög, ungefär 2 cm hög och med 3 cm diameter, med en liten fördjupning i toppen. Ett par droppar vatten tillsätts i fördjupningen och man iakttar om a) gas utvecklas och b) om gasen antänds. Om gasen antänds behöver ämnet inte undersökas ytterligare eftersom ämnet betraktas som farligt.

▼B

1.6.4 **Steg 4**

1.6.4.1 *Apparatur*

Apparaturen monteras enligt figuren.

1.6.4.2 *Testbetingelser*

Undersök om behållaren, i vilken testämnet finns, innehåller pulver < 500 μm (partikelstorlek). Om pulvret utgör mer än 1 % viktprocent av den totala mängden, eller om provet är sprött, ska hela ämnet malas till pulver innan det undersöks för att medge en minskning av partikelstorleken under lagring och hantering. I övrigt ska ämnet användas i det tillstånd det togs emot. Testet ska utföras vid rumstemperatur (20 °C) och atmosfäriskt tryck.

1.6.4.3 *Testförfarande*

10 till 20 ml vatten tillsätts i apparatens dropptratt, och 10 g av ämnet placeras i den koniska kolven. Den gasvolym som utvecklas kan mätas med lämplig metod. Kranen på dropptratten öppnas för att släppa in vattnet i den koniska kolven och ett stoppur startas. Gasutvecklingen mäts varje timme under en sjutimmarsperiod. Om gasutvecklingen är oregelbunden under denna period, eller om hastigheten för gasutvecklingen ökar vid slutet av denna period, fortsätter mätningarna i upp till fem dagar. Om gasutvecklingen vid någon tidpunkt överstiger 1 liter/timme kan testet avbrytas. Detta test ska utföras tre gånger.

Om gasens kemiska identitet är okänd ska gasen analyseras. Om gasen innehåller mycket brandfarliga komponenter och det är okänt om hela blandningen är mycket farlig, ska en blandning med samma sammansättning framställas och undersökas enligt testmetod A.11.

2. **DATA**

Ämnet anses farligt om

— spontan antändning sker under testförfarandet,

eller

— brandfarlig gas utvecklas i högre mängd än 1 liter/kg substans per timme.

3. **RAPPORTERING**

Testrapporten ska om möjligt innehålla följande uppgifter:

— Exakt specificering av ämnet (beteckning och orenheter).

— Uppgifter om eventuell inledande behandling av testämnet.

▼B

— Testresultaten (steg 1, 2, 3 och 4).

— Den utvecklade gasens kemiska sammansättning.

— Gasens utvecklingshastighet och steg 4 (1.6.4) utfördes.

— Eventuella ytterligare upplysningar som är av betydelse för tolkningen av resultaten.

4. **HÄNVISNINGAR**

1. Recommendations on the transport of dangerous goods, test and criteria, 1990, United Nations, New York.

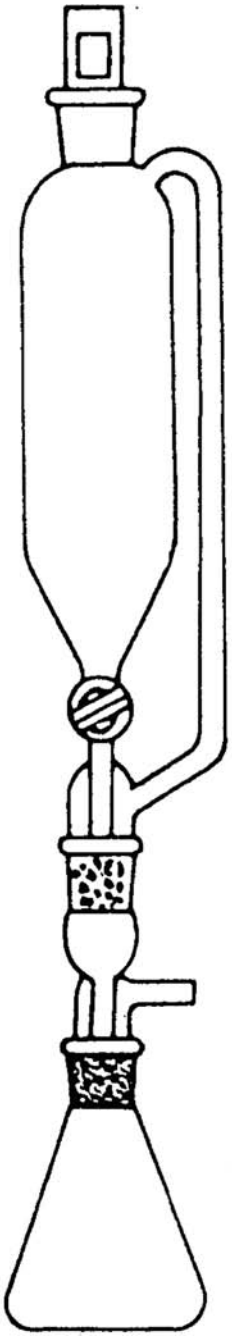
2. NF T 20-040 (Sept. 85). Chemical products for industrial use. Determination of the flammability of gases formed by the hydrolysis of solid and liquid products.

▼B

Tillägg

Figur

Apparatur



▼B

A.13 PYROFORISKA EGENSKAPER HOS FASTA OCH FLYTANDE ÄMNEN

1. METOD

1.1 INLEDNING

Testförfarandet kan tillämpas på fasta och flytande ämnen som i små mängder antänds spontant kort tid efter det att de har kommit kontakt med luft vid rumstemperatur (cirka 20 °C).

Ämnen som kräver timmar eller dagar vid rumstemperatur eller förhöjd temperatur innan de självantänds omfattas inte av denna testmetod.

1.2 DEFINITIONER OCH ENHETER

Ämnen anses vara mycket brandfarliga om de antänds eller förkolnar under de betingelser som beskrivs i 1.6.

Det kan även vara nödvändigt att undersöka vätskors självantändlighet med metod A.15: Självantändlighetstemperatur (vätskor och gaser).

1.3 REFERENSÄMNEN

Inte angivna.

1.4 TESTMETODSPRINCIP

Ämnet, fast eller flytande, blandas med en inaktiv bärare och får under fem minuter vara i kontakt med luften vid rumstemperatur. Flytande ämnen som inte fattar eld absorberas sedan de på filterpapper och utsätts under fem minuter för luftens påverkan vid rumstemperatur (cirka 20 °C). Fasta och flytande ämnen som fattar eld och vätskor som fattar eld eller får filterpappret att förkolna anses vara självantändliga.

1.5 KVALITETSKRITERIER

Repeterbarhet: Av säkerhetsskäl räcker det med ett positivt resultat för att ämnet ska bedömas vara självantändligt.

1.6 METODBESKRIVNING

1.6.1 **Apparatur**

En porslinskopp, diameter ca 10 cm, fylls med kiselgur upp till ungefär 5 mm höjd vid rumstemperatur (ca 20 °C).

Anmärkning:

Kiselgur eller annat jämförbart inert ämne som är allmänt tillgängligt ska anses vara representativt för jord på vilken testämnet kan spillas ut vid en olyckshändelse.

Det behövs ett torrt filterpapper för att testa vätskor som inte fattar eld vid kontakt med luften när de blandas med en inaktiv bärare.

▼B

1.6.2 **Testförfarande**

a) *Pulverformiga fasta ämnen*

1–2 cm^3 av det pulverformiga testämnet hälls från cirka 1 m höjd på en icke brännbar yta, varvid iakttas om ämnet antänds under fallet eller innan det har gått fem minuter efter det att det har lagt sig.

Testet utförs sex gånger såvida inte antändning sker.

b) *Vätskor*

Cirka 5 cm^3 av testvätskan hälls i den förberedda porslinskoppen, varvid iakttas om ämnet antänds inom fem minuter.

Orn inte antändning sker i något av de sex testerna utförs följande test:

Med en injektionsspruta sprutas 0,5 ml av provet på ett böjt filterpapper och det observeras om antändning eller förkolning av filterpappret sker inom fem minuter. Testet utförs tre gånger såvida inte antändning eller förkolning sker.

2. **DATA**

2.1 TOLKNING AV RESULTAT

Testet kan avbrytas så snart som ett av testen ger positivt resultat.

2.2 UTVÄRDERING

Om ämnet fattar eld inom fem minuter efter det har tillsatts till en inaktiv bärare och exponeras för luft, eller en vätska får en bit filterpapper att förkolna eller fatta eld inom fem minuter efter det att ämnet tillsatts och utsatts för luftens påverkan anses ämnet självantändligt.

3. **RAPPORTERING**

Testrapporten ska om möjligt innehålla följande uppgifter:

— Exakt specificering av ämnet (beteckning och orenheter).

— Testresultaten.

— Eventuella ytterligare upplysningar som är av betydelse för tolkningen av resultaten.

4. **HÄNVISNINGAR**

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 EXPLOSIVA EGENSKAPER

1. METOD

1.1 INLEDNING

Metoden innefattar ett testschema för att bestämma om ett fast, flytande eller pastaaktigt ämne eller preparat utgör en explosionsfara om det utsätts för påverkan av en öppen låga (värmesensitivitet) eller slag- eller friktionspåverkan (sensitivitet för mekanisk påverkan) och om ett flytande ämne utgör en explosionsfara om det utsätts för påverkan av en öppen låga eller slag.

Metoden består av tre delar:

a) test av värmesensitiviteten (se hänvisning 1),

b) test av mekanisk sensitivitet avseende slagpåverkan (se hänvisning 1),

c) test av mekanisk sensitivitet avseende friktionspåverkan (se hänvisning 1).

Metoden ger data för att utvärdera sannolikheten att det vid vissa ovanliga påverkningar framkallas en explosion. Metoden är inte avsedd att säkerställa om ett ämne över huvud taget kan explodera.

Metoden är lämplig för att bestämma om ett ämne innebär en explosionsfara (värme- och mekanisk känslighet) under de särskilda betingelser som anges i direktivet. Metoden grundas på ett antal apparater som är allmänt använda internationellt (se hänvisning 1) och som vanligtvis ger användbara resultat. Det erkänns att metoden inte är definitiv. Alternativ apparatur kan användas förutsatt att den är internationellt erkänd och att de erhållna resultaten kan korreleras med de resultat som erhållits med den angivna apparaturen.

Testen behöver inte utföras om det enligt föreliggande termodynamiska uppgifter (t.ex. bildningsvärme, nedbrytningsvärme) och/eller frånvaro av vissa reaktiva grupper (se hänvisning 2) i strukturformeln är ställt utom rimligt tvivel att ämnet inte kan brytas ned, bilda gaser och frigöra värme mycket snabbt (dvs. materialet utgör inte någon explosionsrisk). Ett test av mekanisk sensitivitet avseende friktion krävs inte för flytande ämnen.

1.2 DEFINITIONER OCH ENHETER

Explosiva:

Ämnen som kan explodera när de utsätts för en öppen låga eller som är känsliga för slag och friktion i den angivna apparaturen (eller är mer mekaniskt känsliga än 1,3-dinitrobensen i alternativ apparatur).

1.3 REFERENSÄMNE

1,3-dinitrobensen, teknisk kristallinprodukt som siktats genom 0,5 mm, för friktions- och slagpåverkanmetoden.

Perhydro-l,3,5-trinitro-l,3,5-triazin (RXD, hexogen, cyclonit – CAS 121-82-4), omkristalliserad från vattnigt cyclohexanon, våtsiktad genom en 250 μm och bibehållen i en 150 μm sil, torkad vid 103 ± 2 °C (i 4 timmar) för den andra serien av friktions- och slagtester.

▼B

1.4 TESTMETODSPRINCIP

Förberedande tester är nödvändigt för att fastställa säkra betingelser för utförandet av de tre sensitivitetstestet:

1.4.1 **Test för säkerhet vid hantering (se hänvisning 3)**

Av säkerhetsskäl ska, innan huvudtestet inleds, mycket små prov (cirka 10 mg) av ämnet utsättas för upphettning, utan att vara inneslutna, med en gaslåga, för slagpåverkan i lämplig typ av apparatur och friktionspåverkan genom användning av en hammare mot ett städ eller någon typ av friktionsmaskin. Syftet är att fastställa om ämnet är så sensitivt och explosivt att de föreskrivna sensitivitetstesterna, särskilt test av värmekänsligheten, ska utföras med särskilda försiktighetsåtgärder för att undvika att den som utför testen skadas.

1.4.2 **Värmekänslighet**

Metoden innebär att ämnet värms upp i ett stålrör som stängs med en strypfläns med olika håldiametrar. På detta sätt kan man bestämma om ämnet är benäget att explodera under intensiv värmepåverkan vid väl definierad inneslutning.

1.4.3 **Mekanisk känslighet (slagpåverkan)**

Metoden innebär att ämnet utsätts för slagpåverkan från en bestämd massa från en bestämd höjd.

1.4.4 **Mekanisk känslighet (friktion)**

Metoden innebär att ämnet eller preparatet utsätts för friktion mellan standardytor under specificerade betingelser för belastning och relativ rörelse.

1.5 KVALITETSKRITERIER

Inte angivna.

1.6 METODBESKRIVNING

1.6.1 **Värmekänslighet (effekt av öppen liga)**

1.6.1.1 *Apparatur*

Apparaturen består av ett engångsstålrör med en återanvändbar stängningsanordning (se figur 1) som placeras i en uppvärmnings- och skyddsanordning. Röret är tillverkat av djupdragen stålplåt (se tillägg) och har en innerdiameter av 24 mm, en längd av 75 mm och en väggtjocklek av 0,5 mm. I den öppna änden är röret flänsat så att det kan slutas med strypflänsanordningen (figur 1). Detta består av en tryckmotståndskraftig skyddsfläns med ett hål i mitten, som är stadigt förankrad till ett rör genom ett tvådelat skruvförband (mutter och gängad krage). Muttern och den gängade kragen är tillverkade av krom-manganstål (se tillägg), vilket är gnistfritt upp till 800 °C. Det finns strypflänsar med en rad olika håldiametrar, som är gjorda av 6 mm tjockt värmebeständigt stål (se tillägg).

▼B

1.6.1.2 *Testbetingelser*

Normalt testas ämnet i den form det är mottaget, men i vissa fall, t.ex. om det är pressat, gjutet eller på annat sätt sammanpressat, kan det vara nödvändigt att testa ämnet efter sönderdelning.

För fasta ämnen bestäms den mängd material som ska användas för varje test genom ett förfarande i två steg. I det första steget fylls ett tarterat rör med 9 cm ^{3}av ämnet som sammanpressas med en kraft av 80 N fördelat över hela rörtvärsnittet. Av säkerhetsskäl, eller om ämnet kan ändra fysisk form vid kompression, kan andra påfyllningsförfaranden användas. Sammanpressning är t.ex. inte lämpligt om ämnet är mycket friktionskänsligt. Om materialet kan komprimeras tillsätts och sammanpressas mera tills röret är fyllt till en höjd av 55 mm från överkanten. Den totala mängd som har använts för att fylla röret till denna höjd bestäms och ytterligare 2 portioner som sammanpressas med en kraft av 80 N tillsätts. Därefter tillsätts material genom sammanpressning eller så avlägsnas material tills röret är fyllt till 15 mm från överkanten. Det andra steget består i att en tredjedel av den samlade mängd som användes i det första steget tillsätts och sammanpressas. Därefter tillsätts ytterligare 2 portioner som sammanpressas med en kraft av 80 N och materialets höjd i röret justeras till 15 mm från överkanten genom tillsättning eller avlägsnande av material. Vid varje försök används den mängd fast ämne som har fastställts i detta andra steg. Påfyllningen sker i tre lika stora portioner som var och en komprimeras till 9 cm^3 med den kraft som krävs. (Detta är lättast att göra genom användning av avståndsringar.)

Vätskor och geléaktiga ämnen fylls i röret till en höjd av 60 mm varvid försiktighet iakttas med geléaktiga ämnen för att undvika luftbubblor under påfyllning. Den gängade kragen förs upp på röret underifrån, den valda strypflänsen sätts in och muttern åtstramas efter smörjning med ett molybdensulfidbaserat smörjmedel. Det är viktigt att kontrollera att inget ämne har fastnat mellan flänsen och plattan eller i gängorna.

Uppvärmningen sker med propan, som från en industriell cylinder med tryckreglator (60–70 mbar) leds genom en mätare och fördelas jämnt till fyra brännare genom en anslutning (vilket kontrolleras genom visuell inspektion av brännarnas lågor).

1.6.1.3 *Testförfarande*

Varje test pågår tills röret antingen sönderdelas eller har varit uppvärmt i 5 minuter. Ett test vid vilket röret sönderdelas i tre eller flera fragment, som eventuellt hänger ihop med smala metallstrimlor enligt figur 2, betraktas som en explosion. Ett test som leder till färre fragment eller ingen fragmentering betraktas inte som en explosion.

▼B

Först utförs tre tester med en strypfläns med ett 6 mm hål, och om ingen explosion sker utförs ytterligare tre test med en strypfläns med ett 2 mm hål. Om explosion sker under ett av dessa tester är ytterligare testning inte nödvändig.

1.6.1.4 *Utvärdering*

Testresultatet anses positivt om en explosion inträffar i en av ovan nämnda testserier.

1.6.2 **Mekanisk sensitivitet (slagpåverkan)**

1.6.2.1 *Apparatur (figur 4)*

En typisk fallhammarapparatur består i huvudsak av ett gjutstålsblock med fot, städ, pelare, gejder, fallvikter, utlösningsmekanism och provhållare. Stålstädet, 100 mm (diameter) × 70 mm (höjd) är fastskruvat ovanpå ett stålblock, 230 mm (längd) × 250 mm (bredd) × 200 mm (höjd) med gjuten fot, 450 mm (längd) × 450 mm (bredd) × 60 mm (höjd). En pelare bestående av en heldraget stålrör är fastsatt i en hållare som är fastskruvad bak på stålblocket. Apparaten är förankrad i ett massivt betongblock, 60 x 60 x 60 cm med fyra skruvar, så att gejderna är fullständigt lodräta och fallvikterna kan falla fritt. Det finns fallvikter på 5 och 10 kg framställda i massivt stål. Slagvikternas slagyta är av härdat stål, HRC 60–63, och har en diameter av minst 25 mm.

Provet placeras i en slaganordning som består av två massiva stålcylindrar som är placerade koaxialt ovanför varandra i en ihålig cylindrisk styrring av stål. Stålcylindrarna ska ha en diameter av 10 (–0,003, –0,005) mm och en höjd av 10 mm och ha polerade ytor, rundade kanter (kurvradie 0,5 mm) och en hårdhet av HRC 58–65. Den ihåliga cylindern ska ha en utvändig diameter av 16 mm, en polerad urborrning av 10 (+0,005, +0,010) mm och en höjd av 13 mm. Slaganordningen samlas på ett mellanstäd (diameter 26 mm, höjd 26 mm) av stål och centreras med en ring i vilken det finns perforeringar för att leda bort rökgaser.

1.6.2.2 *Testbetingelser*

Provet ska ha en volym på 40 mm^3 eller en volym som passar till en alternativ apparatur. Fasta ämnen testas i torrt tillstånd och förbereds enligt följande:

a) Pulverformiga ämnen siktas (siktstorlek 0,5 mm); allt som har passerat sikten används till testet.

b) Pressade, gjutna eller på annat sätt sammanpressade ämnen sönderdelas och siktas, siktfraktioner från 0,5–1 mm i diameter används vid testet.

Ämnen som normalt förekommer i pastaform bör om möjligt testas i torrt tillstånd och under alla omständigheter efter borttagning av så mycket upplösningsmedel som möjligt. Vätskor testas med ett avstånd av 1 mm mellan den översta och den nedersta stålcylindern.

▼B

1.6.2.3 *Testförfarande*

En serie av sex tester utförs i vilka den 10 kg tunga massan får falla från 0,40 m (40 J). Om en explosion erhålls under de sex testerna vid 40 J måste en andra serie bestående av sex tester utföras i vilka en 5 kg tung massa får falla från 0,15 m (7,5 J). I andra apparaturer jämförs provet med det valda referensämnet med användning av ett fastställt förfarande (tvåslagsteknik osv.).

1.6.2.4 *Utvärdering*

Testresultatet anses positivt om en explosion (eldutveckling och knall är likvärdiga med explosion) inträffar minst en gång i ett av testerna med den beskrivna slagapparaturen eller provet är mer sensitivt än 1,3-dinitrobensen eller RXD i en alternativt slagpåverkantest.

1.6.3 **Mekanisk sensitivitet (friktion)**

1.6.3.1 *Apparatur (figur 5)*

Friktionsapparaturen består av en bottenplatta av gjuten stål på vilken själva friktionsanordningen är monterad. Denna består av en fast porslinspinne och rörliga porslinsplåtar. Porslinsplåten är fäst i en glidbar vagga som rör sig mellan två skenor. Vaggan drivs via en drivstång, en excentrisk trissa och en överföringsväxel av en elektrisk motor på sådant sätt att porslinsplåten rörs under porslinspinnen med en bakåt- och framåtgående rörelse på 10 mm. Porslinspinnen ska belastas med t.ex. 120 eller 360 newton.

Porslinsplattorna är tillverkade av vitt tekniskt porslin (uppruggningsdjup 9–32 μm) och har dimensionerna 25 mm (längd) × 25 mm (bredd) × 5 mm (höjd). Även den cylindriska porslinspinnen är tillverkad av vitt tekniskt porslin, är 15 mm lång, har en innerdiameter på 10 mm och uppruggade sfäriska ändytor med en rundningsradie på 10 mm.

1.6.3.2 *Testbetingelser*

Provet ska ha en volym av 10 mm^3 eller en volym som passar till en alternativ apparatur.

Fasta ämnen testas i torrt tillstånd och förbereds enligt följande:

a) Pulverformiga ämnen siktas (siktstorlek 0,5 mm); allt som har passerat sikten används till testet.

b) Pressade, gjutna eller på annat sätt sammanpressade ämnen sönderdelas och siktas, siktfraktioner < 0,5 mm i diameter används vid testet.

Ämnen som normalt förekommer i pastaform bör om möjligt testas i torrt tillstånd. Om ämnet inte kan testas i torrt tillstånd ska pastan (efter borttagning av så mycket upplösningsmedel som möjligt) testas som en 0,5 mm tjock, 2 mm bred och 10 mm lång film, som framställs med en speciell form.

▼B

1.6.3.3 *Testförfarande*

Porslinspinnen anbringas på testprovet och vikten hängs på. När testet utförs ska slipmärkena på porslinsplattan ligga tvärs emot rörelseriktningen. Kontrollera noggrant att pinnen vilar på provet, att tillräckligt med testämne ligger under pinnen och att plattan rör sig korrekt under pinnen. För pastaaktiga ämnen används en 0,5 mm tjock form med en hål av 2 × 10 för att anbringa ämnet på plattan. Porslinsplattan ska flytta sig 10 mm fram och tillbaka under porslinspinnen under 0,44 sekunder. Varje del av porslinsplattan och porslinspinnen får endast användas en gång. Varje pinnes två ändar räcker till två försök och de två ytorna på en platta räcker vardera för tre försök.

Sex försök med en belastning av 360 N utförs. Om en explosion förekommer i ett av dessa sex försök utförs en ny serie med sex försök med en belastning av 120 N. I andra apparater jämförs proven med det valda referensämnet med hjälp av ett fastställt förfarande (t.ex. up- and down-teknik).

1.6.3.4 *Utvärdering*

Testresultatet anses positivt om en explosion (krepitation, eldutveckling och knall är likvärdiga med explosion) inträffar minst en gång i ett av testerna med den beskrivna friktionsapparaturen eller de motsvarande kriterierna i ett alternativ friktionstest är uppfyllda.

2. **DATA**

Ett ämne anses i princip vara explosionsfarligt i direktivets bemärkelse om ett positivt resultat erhålls i testet av värmesensitivitet, slagpåverkantest eller friktionspåverkantest.

3. **RAPPORTERING**

3.1 TESTRAPPORT

Testrapporten ska om möjligt innehålla minst följande uppgifter:

— Testämnets beteckning, sammansättning, renhet, fukthalt osv.

— Provets fysiska form och om det har krossats, brutits eller siktats.

— Iakttagelser under värmesensitivitetstestet (t.ex. provmassa, antal fragment).

— Iakttagelser under testet av mekanisk känslighet (t.ex. avsevärd rökutveckling eller fullständig nedbrytning utan knall, lågor, gnistor, sprakning).

— Resultat för varje test.

— Vetenskapliga grunder för eventuell användning av alternativ apparatur, samt tecken på korrelation mellan resultat som erhållits med beskriven apparatur och de som erhållits med likvärdig apparatur.

▼B

— Alla relevanta kommentarer, t.ex. hänvisning till test med liknande produkter, som kan vara av betydelse för en korrekt tolkning av resultaten.

— Alla ytterligare kommentarer som är relevanta för tolkning av resultaten.

3.2 TOLKNING OCH UTVÄRDERING AV RESULTAT

I testrapporten ska alla resultat som anses vara falska, avvikande eller icke representativa anges. Om något resultat ska bortses från ska en förklaring ges och resultaten av ett alternativt eller kompletterande test anges. Om ett avvikande resultat inte kan förklaras på detta sätt ska det godtas för vad det är och i enlighet därmed användas vid klassificering av ämnet.

4. **HÄNVISNINGAR**

1. Recommendations on the Transport of Dangerous Goods: Test and criteria., 1990, Förenta nationerna, 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. och Swart, K. H., Explosivstoffe, 1961, vol. 3, s. 6–13 och 30–42.

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

▼B

Tillägg

Exempel på materialspecifikation för värmesensitivitetstestet (se DIN 1623)

1. Rör: Materialspecifikation nr 1.0336.505 g.
2. Strypfläns: materialspecifikation nr 1.4873.
3. Gängad krage och mutter: materialspecifikation nr 1.3817.

Figur 1

Apparatur för värmesensitivitetstest

(Alla mått i mm)

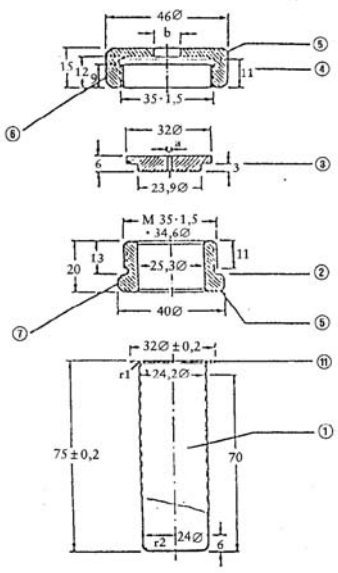


Fig. 1a Stålrör och tillbehör

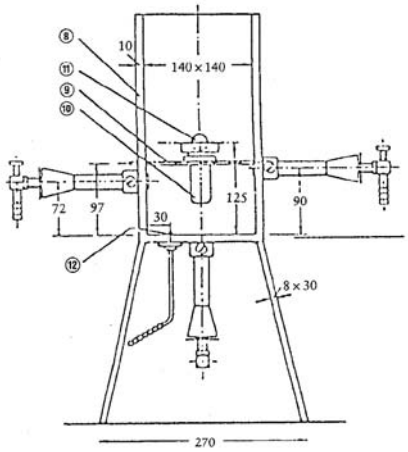


Fig. Ib Värme- och skyddsanordning

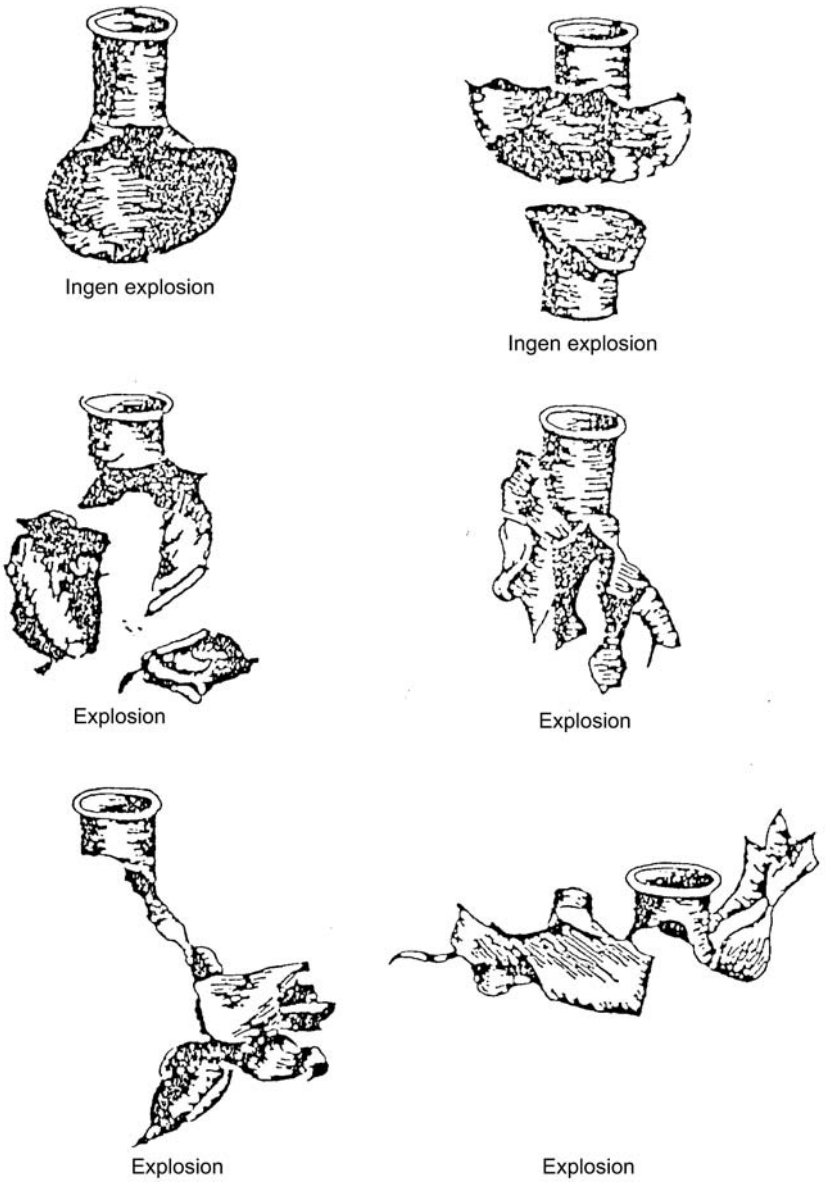
1. rör
1a. utvandig fläns
2. gängad krage, lågfriktionsgänga
3. strypfläns a = 2.0 eller 6.0 mm i diameter
4. mutter b = 10 mm i diameter
5. fasad yta
6. 2 tag för nyckelvidd 41
7. 2 tag för nyckelvidd 36
8. splitterfri låda
9. 2 stödpinnar för ror
10. provrör
11. position för bakre brännare, de andra brannarna ar synliga
12. pilotjet

▼B

Figur 2

Värmesensitivitetstest

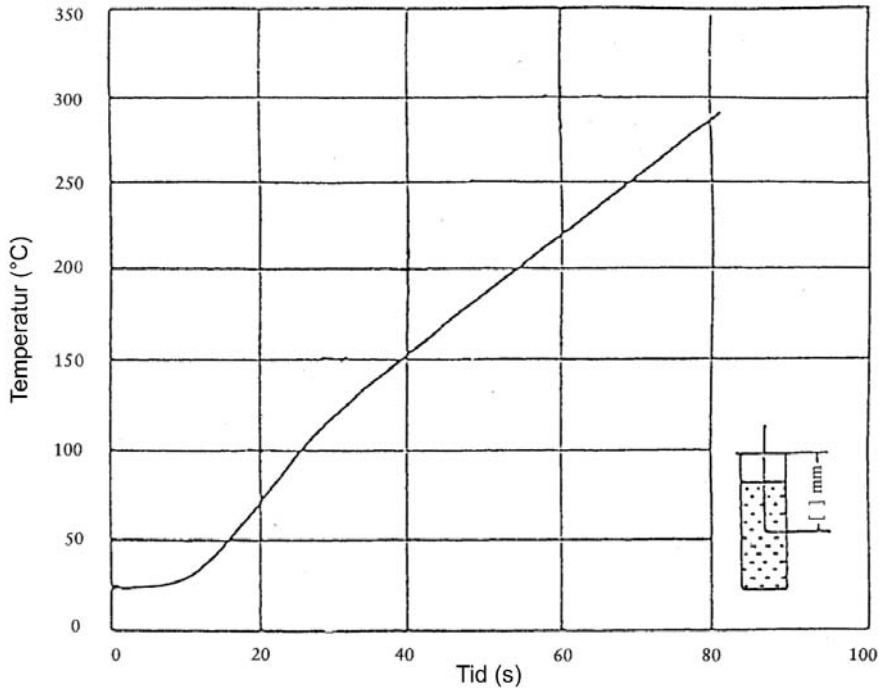
Exempel på fragmentering



▼B

Figur 3

Kalibrering av uppvärmningshastigheten vid test av värmesensitivitet



Kurvan över temperaturförloppet mot tiden vid uppvärmning av dibutylftalat (27 cm^3) i ett stängt rör (strypfläns med 1,5 mm hål) med ett propanflöde av 3,2 liter/minut. Temperaturen är mätt med kromel/alumel-termoelement med 1 mm inkapsling i rostfritt stil, placerat centralt 43 mm under rörens överkant. Mellan 135 ^oC och 285 ^oC ska uppvärmningshastigheten vara 185–215 K/minut.

▼B

Figur 4

Slagpåverkanapparatur

(Alla mått i mm)

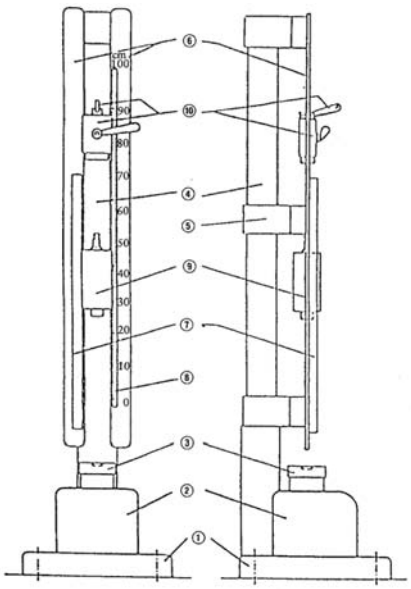


Fig. 4a Fallhammare, framifrån och från sidan, allmän överblick

1. fot, 450 x 450 x 60
2. stålblock. 230 x 250 x 200
3. stad, 100 mm i diameter x 70
4. pelare
5. mellantravers
6. 2 gejder
7. kuggstång

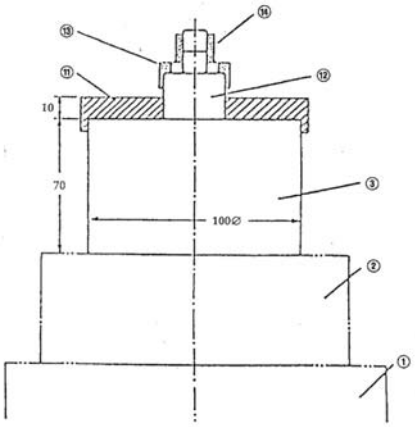


Fig. 4b Fallhammare, lägre del

8. graderad skala
9. fallhammare (fallvikt)
10. fasthållnings- och utlösningsanordning
11. styrplatta
12. mellanstäd (utbytbart); 26 diameter x 26
13. styrring med häl
14. slaganordning

▼B

Figur 4

Fortsättning

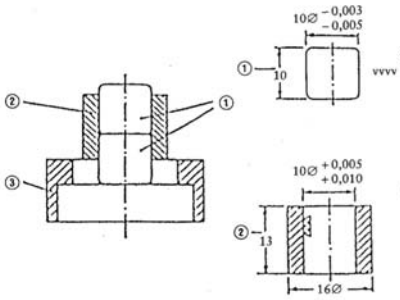


Fig. 4c Slagpåverkananordning för ämnen i pulver- eller pastaform

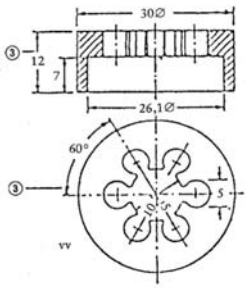
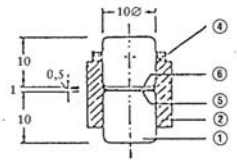


Fig. 4d Slaganordning för vätskor

1. stålcylindrar
2. ring för stålcylindrar
3. centrerring med hål
   a. lodrät genomskärning
   b. plan
4. gummiring
5. vätska (40 mm³)
6. vätskefritt område



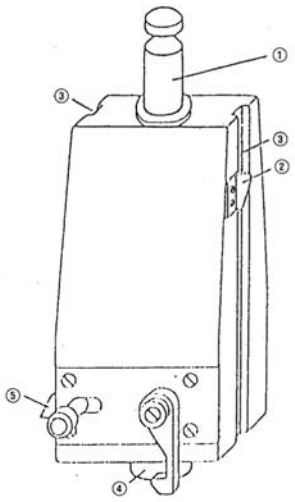


Fig. 4e Hammare (fallvikt 5 kg)

1. upphangmngstapp
2. höjdmärke
3. styrfals
4. cylindriskt slaghuvud
5. bakslagshake

▼B

Figur 5

Apparatur för friktionssensitivitet

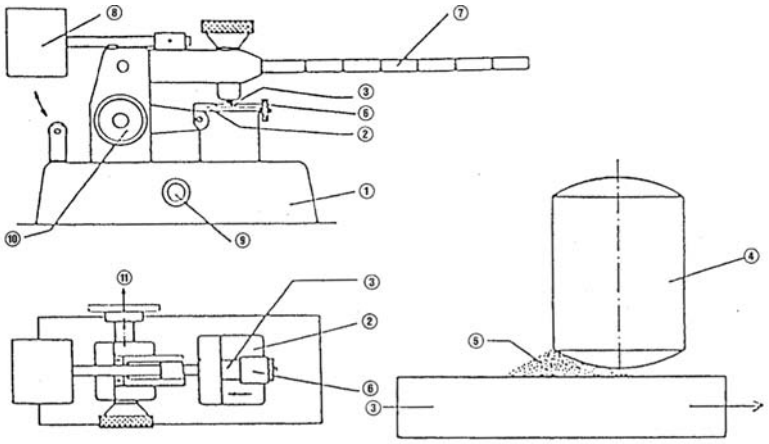


Fig. 5a Friktionsapparatur: vertikalprojektion och grundritning

Fig. 5b Startposition for pinne på prov

1. bottenplatta av stål
2. glidbar vagga
3. porslinsplatta, 25 x 25 x 5 mm, fäst på vagga
4. fast porslinspinne
5. testprov, cirka 10 mm^3
6. pinnhållare
7. Jastarm
8. motvikt
9. omkopplare
10. ratt för inställning av vagga vid startposition
11. riktning mot elektrisk drivmotor

▼B

A.15 SJÄLVANTÄNDNINGSTEMPERATUR (VÄTSKOR OCH GASER)

1. METOD

1.1 INLEDNING

Explosiva ämnen och ämnen som antänds spontant vid kontakt med luft vid omgivningstemperatur, ska inte användas vid detta test. Testförfarandet får tillämpas på gaser, vätskor och ångor som i närvaro av luft kan antändas av en varm yta.

Självantändningstemperaturen kan sänkas avsevärt vid förekomst av katalytiska orenheter, av ytmaterialet eller av en större volym på testkärlet.

1.2 DEFINITIONER OCH ENHETER

Graden av självantändlighet uttrycks som självantändningstemperaturen. Självantändningstemperaturen är den lägsta temperatur vid vilken testämnet antänds när det blandas med luft under de betingelser som definierats för testmetoden.

1.3 REFERENSÄMNEN

Referensämnen återges i standarderna (1.6.3). De ska först och främst användas till att emellanåt kalibrera metoden och till att möjliggöra en jämförelse av resultaten från andra metoder.

1.4 TESTMETODSPRINCIP

Med denna metod bestäms den lägsta temperaturen hos den invändiga ytan i ett slutet rum, vid vilken en gas, ånga eller vätska som sprutas in i rummet, fattar eld.

1.5 KVALITETSKRITERIER

Repeterbarheten varierar beroende på självantändlighetens temperaturområde och den använda testmetoden.

Sensitiviteten och specificiteten beror på den använda testmetoden.

1.6 METODBESKRIVNING

1.6.1 **Apparatur**

Apparaturen finns beskriven i den metod som avses i 1.6.3.

1.6.2 **Testbetingelser**

Ett prov av testämnet undersöks enligt den metod som avses i 1.6.3.

1.6.3 **Testförfarande**

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

▼B

2. **DATA**

Testtemperaturen, atmosfäriskt tryck, mängden använt prov och tidsintervall registreras innan antändning sker.

3. **RAPPORTERING**

Testrapporten ska om möjligt innehålla följande uppgifter:

— Exakt specifikation av ämnet (beteckning och orenheter).

— Mängden använt prov, atmosfäriskt tryck.

— Använd apparatur.

— Mätresultaten (testtemperaturer, resultat beträffande antändning, motsvarande tidsintervall).

— Alla ytterligare upplysningar som är av betydelse för tolkningen av resultaten.

4. **HÄNVISNINGAR**

Inga.

▼B

A.16 RELATIV SJÄLVANTÄNDNINGSTEMPERATUR (FASTA ÄMNEN)

1. METOD

1.1 INLEDNING

Explosiva ämnen och ämnen som antänds spontant vid kontakt med luft vid omgivningstemperatur ska inte användas vid detta test.

Syftet med detta test är att få preliminära uppgifter om fasta ämnens självantändlighet vid förhöjda temperaturer.

Om den värme som utvecklas, antingen genom ämnets reaktion med syre eller genom exoterm nedbrytning, inte avges tillräckligt snabbt till omgivningen inträffar en självuppvärmning som leder till självantändning. Självantändning inträffar således när värmeproduktionens hastighet överstiger värmeförlustens hastighet.

Testförfarandet är värdefullt som ett förberedande screentest för fasta ämnen. Med tanke på det komplicerade förhållandet vid antändning och förbränning av fasta ämnen, ska självantändningstemperaturen som bestäms enligt denna metod endast användas i jämförande syfte.

1.2 DEFINITIONER OCH ENHETER

Den självantändningstemperatur som erhållits med denna metod är den lägsta omgivningstemperatur, uttryckt i ^{o}C, vid vilken en viss volym av ett ämne självantänds under definierade betingelser.

1.3 REFERENSÄMNEN

Inga.

1.4 TESTMETODSPRINCIP

En viss volym av testämnet placeras i en ugn vid rumstemperatur; temperatur-/tidskurvan avseende betingelserna i provets mitt registreras medan temperaturen i ugnen ökas till 400 ^{o}C, eller till smältningspunkten om denna är lägre, med en hastighet av 0,5 ^{o}C per minut. Den ugnstemperatur vid vilken provets temperatur uppnår 400 ^{o}C genom självuppvärmning kallas i detta test självantändningstemperaturen.

1.5 KVALITETSKRITERIER

Inga.

1.6 METODBESKRIVNING

1.6.1 **Apparatur**

1.6.1.1 *Ugn*

En temperaturprogrammerad laboratorieugn (volym ca 2 liter) utrustad med naturlig luftcirkulation och explosionssäkring. För att undvika eventuell explosionsrisk ska det säkerställas att nedbrytningsgaser inte kan komma i kontakt med de elektriska värmeelementen.

▼B

1.6.1.2 *Kub av ståltrådsnät*

En bit rostfritt ståltrådsnät med 0,045 mm maskor skärs till enligt mallen i figur 1. Nätet viks och fästs ihop med tråd till kuber som är öppna på ovansidan.

1.6.1.3 *Termoelement*

Passande termoelement.

1.6.1.4 *Skrivare*

Valfri tvåkanalsskrivare som ar kalibrerad från 0 till 600 °C eller motsvarande spänning.

1.6.2 **Testbetingelser**

Ämnen testas i sin kommersiella form.

1.6.3 **Testförfarande**

Kuben fylls med testämnet och slås med lätta slag varefter ytterligare ämne tillsätts tills kuben är helt fylld. Provet hängs därefter upp i mitten av ugnen vid rumstemperatur. Ugnstemperaturen registreras med ett termoelement som är placerat mitt i kuben och ett annat som är placerat mellan kuben och ugnsväggen.

Ugnens och provets temperaturer avläses fortlöpande medan ugnstemperaturen ökas till 400 °C eller till smältpunkten, om denna är lägre, med en hastighet av 0,5 °C per minut.

När ämnet antänds visar termoelementet i provet en mycket kraftig temperaturhöjning över ugnstemperaturen.

2. **DATA**

Den ugnstemperatur vid vilken provets temperatur uppnår 400 °C genom självuppvärmning är av betydelse för utvärderingen (se figur 2).

3. **RAPPORTERING**

Testrapporten ska om möjligt innehålla följande uppgifter:

— En beskrivning av testämnet.

— Mätresultaten inklusive temperatur/tidskurvor.

— Alla ytterligare upplysningar som är av betydelse för tolkningen av resultaten.

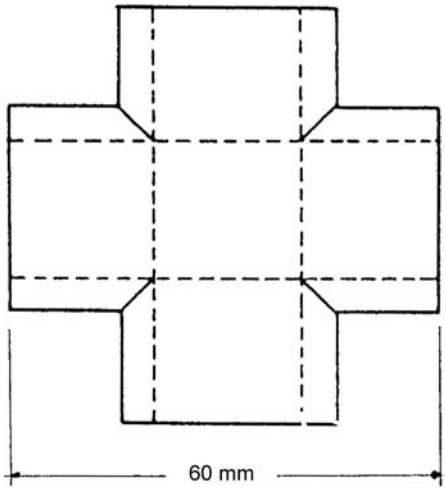
4. **HÄNVISNINGAR**

NF T 20-036 (September 1985). Chemical products for industrial use. Determination of the relative tempe-rature of the spontaneous flammability of solids.

▼B

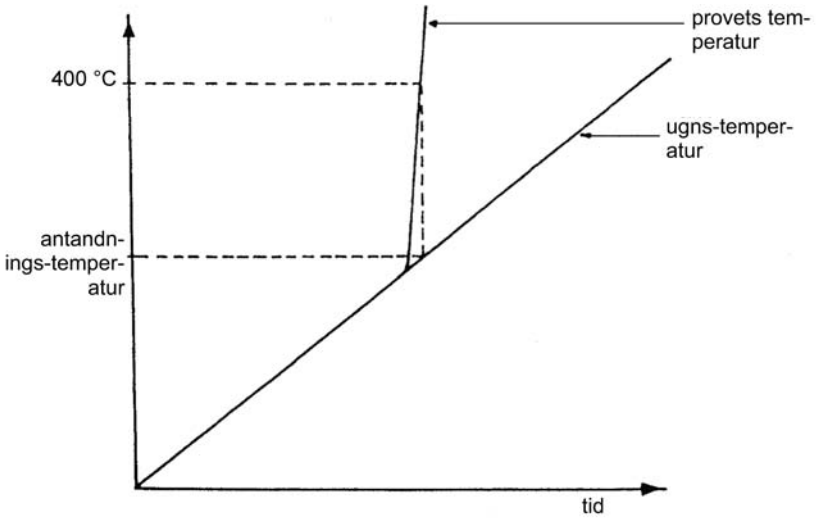
Figur 1

Mall till 20 mm testkub



Figur 2

Typisk temperatur/tidskurva



▼B

A.17 OXIDERANDE EGENSKAPER (FASTA ÄMNEN)

1. METOD

1.1 INLEDNING

Vid utförande av detta test är det värdefullt att ha förhandskunskap om ämnets potentiellt explosiva egenskaper och toxicitet.

Testet får inte tillämpas på vätskor och gaser, explosiva eller mycket brandfarliga ämnen eller organiska peroxider.

Detta test behöver inte utföras om en undersökning av strukturformeln fastslår utom rimligt tvivel att ämnet inte kan reagera exotermt med ett brännbart material.

För att säkerställa om testet ska utföras med iakttagande av särskilda försiktighetsåtgärder, ska ett förberedande test utföras.

1.2 DEFINITIONER OCH ENHETER

Bränntid: Den reaktionstid, i sekunder, som krävs för att reaktionszonen breder ut sig längs en hög, enligt det förfarande som beskrivs i 1.6.

Brännhastighet: Uttrycks i mm per sekund.

Maximal brännhastighet: det högsta värdet för brännhastigheter som erhållits för blandningar innehållande 10–90 viktprocent av det oxiderande ämnet.

1.3 REFERENSÄMNE

Bariumnitrat (analytisk kvalitet) används som referensämne för testet och det inledande screeningtestet.

Referensblandningen är den blandning av bariumnitrat och cellulosapulver som framställts enligt 1.6 och som har den maximala brännhastigheten (vanligtvis en blandning med 60 viktprocent bariumnitrat).

1.4 TESTMETODSPRINCIP

Av säkerhetsskäl utförs ett inledande screeningtest. Detta test är tillräckligt om det klart utvisar att testämnet eller testpreparatet har oxiderande egenskaper. Om så inte är fallet ska ämnet eller preparatet underkastas ett fullständigt test.

Vid det fullständiga testet ska testämnet och en definierat brännbart ämne blandas i olika proportioner. Varje blandning formas sedan till en hög som antänds i ena änden. Den maximala brännhastigheten bestäms därefter och jämförs med referensblandningens maximala brännhastighet.

1.5 KVALITETSKRITERIER

Om så behövs kan valfri malnings- och blandningsmetod användas, förutsatt att skillnaden mellan den maximala brännhastigheten i de sex separata testen inte avviker mer än 10 % från det aritmetiska medelvärdet.

▼B

1.6 METODBESKRIVNING

1.6.1 **Förberedelser**

1.6.1.1 *Testämne*

Testprovet reduceras till en partikelstorlek < 0,125 mm enligt följande förfarande: Sikta testämnet; mal återstående fraktion, upprepa förfarandet tills hela testfraktionen har passerat sikten.

Valfri malnings- och siktningsmetod som uppfyller kvalitetskriterierna får användas.

Innan blandningen framställs ska ämnet torkas vid 105 °C tills konstant vikt har uppnåtts. Om testämnets nedbrytningstemperatur är lägre än 105 °C ska ämnet torkas vid en passande lägre temperatur.

1.6.1.2 *Brännbart ämne*

Cellulosapulver används som brännbart ämne. Cellulosan ska vara av den typ som används vid tunnskiktskromatografi eller kolonnkromatografi. En typ där mer än 85 % av fiberlängderna ligger mellan 0,020 och 0,075 mm har visat sig vara lämplig. Cellulosapulvret passerar genom en sikt med en maskstorlek på 0,125 mm. Samma blandning ska användas i hela testet.

Innan blandningen framställs ska ämnet torkas vid 105 °C tills konstant vikt har uppnåtts.

Om trämjöl används i det förberedande testet ska ett barrvedsmjöl tillredas genom att den del som passerar en sikt med maskstorleken 1,6 mm insamlas, blandas noggrant och sedan torkas vid 105 °C i fyra timmar i ett högst 25 mm tjockt lager. Efter avkylning ska det förvaras i en lufttät behållare, fylld till brädden, tills det ska användas, helst inom 24 timmar efter torkning.

1.6.1.3 *Antändningskälla*

Som antändningskälla används lågan från en gasbrännare (minsta diameter 5 mm). Om en annan antändningskälla används (t.ex. vid testning i en inert atmosfär) ska en beskrivning och en motivering bifogas.

1.6.2 **Testförfarande**

Anmärkning:

Blandningar av oxiderande ämnen med cellulosa eller trämjöl ska behandlas som potentiellt explosiva och hanteras med vederbörlig försiktighet.

1.6.2.1 *Förberedande test*

Det torkade ämnet blandas med det torkade cellulosapulvret eller trämjöl i proportionerna 2 viktdelar av testämnet till 1 viktdel cellulosa eller träm)öl och blandningen formas till en liten konformad hög med måtten 3,5 cm (basens diameter) × 2,5 cm (höjd) genom att en konliknande form (t.ex. ett laboratorieglastratt vars pip är tillsluten) fylls, utan att packas.

▼B

Högen placeras på en kall, icke ledande, ogenomtränglig basplatta. Testet ska utföras i ett dragskåp som i 1.6.2.2.

Antändningskällan sätts i kontakt med konen. Kraften och varaktigheten av den påföljande reaktionen iakttas och registreras.

Ämnet anses vara oxiderande om reaktionen är kraftfull.

Om resultaten på något sätt är tvetydiga ska det nedan beskrivna fullständiga testförfarandet utföras.

1.6.2.2 *Fullständigt test*

En blandning av oxiderande ämne och cellulosa, innehållande 10–90 viktprocent oxiderande ämne, framställs i steg om 10 viktprocent. I gränsfall ska mellanblandningar av oxiderande ämne och cellulosa användas för att få fram en noggrannare maximal brännhastighet.

Högen byggs upp med användning av en form. Formen är tillverkad av metall, har en längd på 250 mm, och en triangelformad tvärsnittssektion med en inre höjd på 10 mm och en inre bredd på 20 mm. På båda sidor om formen monteras i längdriktningen två sidoavgränsande metallplåtar som skjuter upp 2 mm ovanför den triangelformade tvärsnittssektionens övre kant (se figuren). Denna anordning fylls löst och med råge av blandningen. Efter det att formen har fatt falla en gång från 2 cm höjd på en fast yta skrapas återstående överskottsämne bort med en skråställd platta. Därefter avlägsnas sidoavgränsningarna och resterande pulver slätas ut med en kavel. En icke-brännbar plåt placeras sedan ovanpå formen, apparaturen vänds och formen avlägsnas.

Högen placeras i dragskåpet tvärs över luftdragets riktning.

Lufthastigheten ska vara så hög att den förhindrar att rökgaser släpps ut till laboratoriet och ska inte varieras under testet. En dragskärm ska placeras runt apparaturen.

Eftersom cellulosan och testämnena är hygroskopiska ska testet utföras så snabbt som möjligt.

Ena änden av högen tänds på genom beröring av lågan.

När reaktionszonen har förflyttat sig de första 30 mm mäts reaktionstiden över följande 200 mm.

Testet utförs med referensämnet och minst en gång med varje serie av blandningar av testämnet och cellulosa.

Om den maximala brännhastigheten konstateras vara signifikant högre än referensämnets, kan testet avbrytas. I annat fall ska testet upprepas fem gånger med de tre blandningar som gav de högsta brännhastigheterna.

▼B

Om man misstänker att resultatet är felaktigt positivt upprepas testet med ett inert ämne med motsvarande partikelstorlek, t.ex. kiselgur, i stället för cellulosa. Alternativt kan den blandning av testämne och cellulosa som har den snabbaste reaktionshastigheten testas i inert atmosfär (< 2 % v/v syreinnehåll).

2. **DATA**

Av säkerhetsskäl ska den maximala brännhastigheten – inte medelvärdet – anses vara testämnets karakteristiska oxiderande egenskap.

Det högsta värdet för brännhastighet som erhålls vid en testomgång med sex test av en given blandning är relevant for utvärderingen.

Rita en kurva över det högsta värdet för brännhastighet för varje blandning som en funktion av dess innehåll av oxiderande medel. Bestäm den maximala brännhastigheten utifrån kurvan.

De sex matta värdena för brännhastighet, som vid en testomgång erhållits för blandningen med den maximala brännhastigheten, får inte avvika mer än 10 % från det aritmetiska medelvärdet. I annat fall ska malnings- och blandningsmetoderna förbättras.

Jämför den erhållna maximala brännhastigheten med referensblandningens maximala brännhastighet (se 1.3).

Om testen utförs i en inert atmosfär jämförs den maximala brännhastigheten med den från referensblandningen i en inert atmosfär.

3. **RAPPORTERING**

3.1 TESTRAPPORT

Testrapporten ska om möjligt innehålla följande uppgifter:

— Testämnets beteckning, sammansättning, renhet, fukthalt osv.

— Eventuell behandling av testprovet (t.ex. malning eller torkning).

— Använd antändningskälla.

— Mätresultaten.

— Reaktionssättet (t.ex. brinnande låga vid ytan, genombränning av hela massan och alla uppgifter om för bränningsprodukter).

— Alla ytterligare upplysningar som är av betydelse för tolkningen av resultaten, inbegripet en beskrivning av kraften (lågor, gnistor, rök, långsamt pyrande glöd osv.) och ungefärlig varaktighet som iakttagits vid det för beredande säkerhets-screeningtestet för både test- och referensämne.

— Resultat av eventuella tester med ett inert ämne.

— Resultat av eventuella tester i inert atmosfär.

▼B

3.2 TOLKNING AV RESULTATEN

Ett ämne ska anses vara ett oxiderande ämne om

a) en kraftig reaktion inträffar under det inledande screeningtestet

b) den maximala brännhastighet av de blandningar som undersökts vid fullständig testning är högre än eller lika med den maximala brännhastigheten för referensblandningen av cellulosa och bariumnitrat.

För att undvika falska positiva resultat ska de resultat som erhålls vid test av ämnet med ett inert material och vid test i inert atmosfär också beaktas vid tolkning av resultaten.

4. **HÄNVISNINGAR**

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

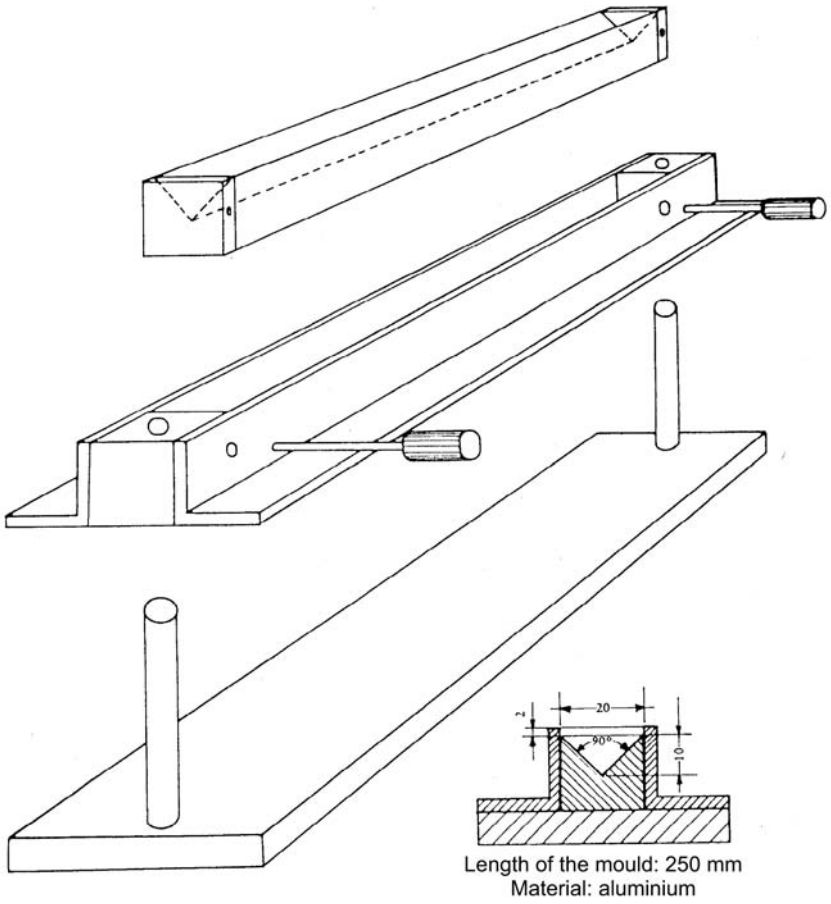
▼B

Tillägg

Figur

Form och tillbehör för iordningställande av högen

(Alla mått i mm)



▼B

A.18 **MOLEKYLÄR MEDEL VIKT OCH MOLEKYLÄR VIKTFÖRDELNING AV POLYMERER**

1. **METOD**

Denna kromatografiska metod (genomträngning i gelé) är en kopia på OECD TG 118 (1996). Grundläggande principer och annan teknisk information finns under hänvisning 1.

1.1 INLEDNING

Eftersom polymerernas egenskaper är så varierande är det omöjligt att beskriva en enda metod som ger exakta förhållanden för separation och bedömning som täcker alla eventualiteter och särskilda företeelser vid separation av polymerer. Särskilt komplexa polymera system är ofta inte mottagliga för kromatografisk analys av genomträngning i gelé (GPC). När GPC inte är praktiskt genomförbart kan den molekylära vikten fastställas med andra metoder (se bilaga). I sådana fall ska fullständig information om och motivering för den använda metoden anges.

Den beskrivna metoden grundas på DIN-standard 55672 (1). Detaljerad information om hur experimentet ska utföras och hur datan ska bedömas finns i denna DIN-standard. Om experimentförhållandena måste ändras, ska dessa förändringar motiveras. Andra standarder får tillämpas om full hänvisning därtill görs. I den beskrivna metoden används polystyrenprover med känd polydispertion för kalibrering, som kan behöva anpassas till vissa polymerer, t.ex. vattenlösliga och anpassade polymerer med långa molekylkedjor.

1.2 DEFINITIONER OCH ENHETER

Den numerära medelmolekylvikten M_n och den viktmässigt molekylära medelvikten M_w fastställs med följande ekvationer:

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

där:

H_i är nivån på detektorsignalen från baslinjen för den kvarhållna volymen V_i,

M_i är polymerfraktionens molekylvikt vid den kvarhållna volymen V_i, och

n är antalet datapunkter.

Bredden på den molekylära viktfördelningen, som är ett mått på systemdispertionen, fås med förhållandet M_w/M_n.

▼B

1.3 REFERENSÄMNEN

Eftersom GPC är en relativ metod måste kalibrering göras. Normalt används tätt fördelad, linjärt konstruerad standardpolystyren med känd medelmolekylvikt M_n och M_w och en känd molekylviktfördelning för detta ändamål. Kalibreringskurvan kan bara användas för fastställande av molekylvikten för det okända provet om separationsförhållandena för provet och standardämnena valts på exakt samma sätt.

Det fastställda förhållandet mellan molekylvikten och urlakningsvolymen gäller enbart under det aktuella experimentets specifika förhållanden. Dessa förhållanden omfattar framför allt temperatur, lösning eller lösningsblandning, kromatografiska förhållanden och separationskolonn eller kolonnsvstem.

Den molekylvikt som fastställs för provet på detta sätt utgörs av relativa värden och beskrivs som polystyrenets molekylära ekvivalensvikt. Detta innebär att molekylvikterna, beroende på struktur och kemisk skillnad mellan provet och standardämnet, kan avvika från de absoluta värdena i större eller mindre utsträckning. Om andra standardämnen används, t.ex. polyetylenglykol, polyetylenoxid, poly-metylmetakrylat, polyakrylsyra, ska skälet därtill anges.

1.4 PRINCIPEN FÖR PROVNINGSMETODEN

Både provets molekylviktfördelning och medelmolekylvikter (M_n, M_w) kan fastställas med hjälp av GPC. GPC är en särskild typ av vätskekromatografi där provet separeras beroende på de enskilda komponenternas hydrodynamiska volymer (2).

Separationen utförs när provet passerar genom en kolonn fylld med poröst material, vanligtvis en organisk gelé. Små molekyler kan passera igenom porerna medan stora molekyler kvarhålls. De stora molekylernas passage blir därför kortare och dessa tas bort först. Medelstora molekyler passerar genom en del av porerna och/eller elueras senare. De minsta molekylerna, med en hydrodynamisk medelradie mindre än porerna i gelén, kan passera genom samtliga porer. Dessa elueras då sist.

I idealsituationen styrs separeringen helt och hållet av molekylstorleken, men i praktiken är det svårt att förhindra att åtminstone en viss absorbtionseffekt inverkar störande. Ojämn packning i kolonnen och döda volymer kan förvärra situationen (2).

Detektionen utförs med t.ex. reflektionsindex eller UV-absorbtion och ger en enkel fördelningskurva. För att kunna tillskriva kurvan den faktiska molekylvikten måste kolonnen kalibreras, genom att polymerer med känd molekylvikt och helst i stort sett liknande struktur, t.ex. olika standardpolysterener, tillåts passera genom kolonnen. Normalt fås en typisk Gaus-kurva, ibland utdragen i en mindre svans på sidan för den låga molekylvikten, om de vertikala axlarna anger mängden, i förhållande till vikten, för de olika molekylvikter som elueras, och den horisontella axeln står för den logaritmiska molekylvikten.

▼B

1.5 KVALITETSKRITERIER

Repeterbarheten (relativ standardavvikelse: RSD) för elutionsvolymen ska vara bättre än 0,3 %. Nödvändig repeterbarhet för analysen måste säkerställas genom korrigering enligt intern standard om ett kromatogram bedöms vara tidsberoende och inte omfattas av ovannämnda kriterier (1). Spridningen beror på standardämnets molekylvikt. Följande värden är typiska för standardpolystyren:

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

(M_p är standardämnets molekylvikt vid toppvärdet.)

1.6 BESKRIVNING AV PROVNINGSMETODEN

1.6.1 **Beredning av lösningar med standardpolystyren**

Standardpolystyrenen löses noggrant genom blandning i vald eluent. Hänsyn måste tas till tillverkarens rekommendationer vid beredning av lösningarna.

Koncentrationen av de standardämnen som väljs beror på olika faktorer, t.ex. injektionsvolym, lösningsviskositet och den analytiska detektorns känslighet. Maximal injektionsvolym måste anpassas till kolonnens längd för undvikande av överbelastning. Typiska injektionsvolymer för analytiska separationer med GPC och en kolonn på 30 cm × 7,8 mm ligger mellan 40 och 100 µl. Större volymer kan användas men bör inte överstiga 250 µl. Det optimala förhållandet mellan injektionsvolym och koncentration måste fastställas innan kolonnen kalibreras.

1.6.2 **Beredning av provlösningen**

I princip gäller samma krav för beredning av provlösning. Provet löses upp i lämpligt lösningsmedel, t.ex. tetrahydrofuran (THF), genom omsorgsfull skakning. Det får under inga omständigheter lösas upp i ultraljudsbad. Vid behov kan provlösningen renas genom ett membranfilter, med en finhet på mellan 0,2 och 2 µm.

Förekomst av oupplösta partiklar måste registreras i slutrapporten, eftersom dessa kan bero på högviktsmolekyler. Lämplig metod ska användas för fastställande av viktandelen oupplösta partiklar. Lösningen bör användas inom 24 timmar.

1.6.3 **Apparater**

— Lösningsbehållare.

— Avluftningsapparat (när så krävs).

— Pump.

▼B

— Pulsdämpare (när så krävs).

— Injektionssystem.

— Kromatografikolonner.

— Detektor.

— Flödesmätare (när så krävs).

— Apparat för registrering/bearbetning av data.

— Avfallskärl.

Det måste säkerställas att GPC-systemet är inert avseende använda lösningsmedel, t.ex. genom användning av stålkapilär för THF-lösningen.

1.6.4 **Injektions- och lösningstillförselsystem**

En definierad volym av lösningsprovet fylls i kolonnen, antingen automatiskt eller manuellt, i en tydligt definierad zon. Alltför snabb utdragning eller intryckning av kolven i sprutan, om fyllningen sköts manuellt, kan förorsaka förändringar i den observerade molekylviktfördelningen. Systemet för tillförsel av lösning ska så långt möjligt vara pulsfritt, helst med inbyggd pulsdämpning. Flödeshastigheten ska vara ca 1 ml/min.

1.6.5 **Kolonn**

Polymeren kännetecknas, beroende på provet, antingen genom användning av enkel kolonn eller genom flera kolonner kopplade i serie. Ett antal porösa kolonnmaterial med definierade egenskaper, t.ex. porstorlek, exklutionsgränser osv., finns kommersiellt tillgängliga. Val av separationsgelé och kolonnlängd beror både på provets egenskaper (hydrodynamisk volym, molekylviktfördelning) och specifika förhållandena för separationen, som t.ex. lösning, temperatur och flödeshastighet (1) (2) (3).

1.6.6 **Teoretiska plattor**

Den kolonn eller kolonnkombination som används för separationen måste karakteriseras av antalet teoretiska nivåer. Detta inkluderar, när THF används som elutionslösning, fyllning av en lösning av etylbensen eller annan lämplig icke-polär lösning i en kolonn med känd längd. Antalet teoretiska nivåer fås med följande ekvation:

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

där:

N = är antalet teoretiska nivåer,

V_e = är elutionsvolymen vid toppvärdet,

▼B

W = är toppvärdets baslinjebredd, och

$W_{1/2}$ = är toppbredden vid halva höjden.

1.6.7 **Separationseffektivitet**

Förutom antalet teoretiska nivåer som styr bandbredden, spelar också separationseffektiviteten, som bestäms av lutningen på kalibreringskurvan, en viss roll. Separationseffektiviteten för en kolonn fås med följande förhållande:

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

där:

$V_{e,\ M_x}$ = är elutionsvolymen för polystyren med molekylvikten M_x och

$V_{e,(10M_x)}$ = är elutionsvolymen för polystyren med en tio gånger större molekylvikt.

Systemets upplösning definieras normalt som:

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

där:

V_{e1} och V_{e2} = är elutionsvolymerna för de två standardpolystyrenerna vid maximalt toppvärde,

W_1 och W_2 = är baslinjebredden vid toppvärde och

M_1 och M_2 = är molekylvikten vid maximalt toppvärde (bör skilja sig åt med en faktor på 10).

R-värdet för kolonnsystemet bör vara större än 1,7 (4).

1.6.8 **Lösningsmedel**

Samtliga lösningsmedel måste ha hög renhet (för THF används en renhet på 99,5 %). Lösningsmedelsbehållaren (om nödvändigt i en inert gasatmosfär) ska vara tillräckligt stor för kalibrering av kolonnen och flera provanalyser. Lösningsmedlet ska avgasas innan det via pumpen transporteras till kolonnen.

1.6.9 **Temperaturövervakning**

Temperaturen i de kritiska interna komponenterna (injektionsslinga, kolonn, detektor och rörsystem) ska vara jämn och anpassad till valt lösningsmedel.

▼B

1.6.10 **Detektor**

Syftet med detektorn är att kvantitativt registrera koncentrationen i det prov som elueras från kolonnen. För att undvika onödig breddning av toppvärden ska detektorcellens kuvettvolym hållas så liten som möjligt. Den bör inte vara större än 10 µl, utom för lättflyktiga och tunna detektorer Differentialrefraktometri används vanligtvis för detektion. Om provets eller elutionslösningens särskilda egenskaper så kräver kan emellertid andra detektortyper användas t.ex. UV/VIS, IR- eller viskositetsdetektorer.

2. **DATA OCH RAPPORTERING**

2.1 DATA

Detaljerade utvärderingskriterier och krav avseende insamling och bearbetning av data ska uppfylla kraven i DIN-standarden (1).

Två sinsemellan oberoende experiment ska utföras för varje prov. Experimenten ska analyseras individuellt.

M_n, M_w, M_w/M_n och M_p ska anges för varje mätning. Det är nödvändigt att uttryckligen ange att uppmätta värden är relativa värden, ekvivalenta mot molekylvikten för det standardämne som använts.

Efter fastställande av retentionsvolymerna eller retentionstiderna (eventuellt korrigerade med en intern standard), plottas log M_p-värdena (M_p är maximalt toppvärde för kalibreringsämnet) mot en av nämnda mängder. Minst två kalibreringspunkter krävs per tiotal molekylvikter och minst fem mätpunkter för den totala kurvan, som ska täcka provets uppskattade molekylvikt. Kalibreringskurvans ändpunkt för den låga molekylvikten definieras av n-hexylbenzen eller annan lämplig icke-polär lösning. Medelantal och medelvikt för molekylvikterna fastställs allmänt med elektronisk databearbetning, baserad på formlerna i avsnitt 1.2. Om manuell digitalisering används kan råd hämtas från ASTM D 3536-91 (3).

Fördelningskurvan ska presenteras i tabellform eller som ett diagram (differentialfrekvens eller summa procentandel mot log M). I den grafiska presentationen ska varje tiotal molekylvikter normalt ha en bredd på 4 cm, och maximalt toppvärde ska ligga på ungefär 8 cm höjd. Vid intregralfördelningskurvor ska skillnaderna mellan 0 och 100 % vara ungefär 10 cm.

2.2 PROVNINGSRAPPORT

Provningsrapporten ska innehålla följande information:

2.2.1 **Undersökt ämne**

— Tillgänglig information om det undersökta ämnet (identitet, tillsatser, föroreningar).

▼B

— Beskrivning av hanteringen av provet, anmärkningar, problem.

2.2.2 **Instrument**

— Eluentbehållare, inertgas, avgasning av eluenten, eluentens sammansättning, föroreningar.

— Pump, pulsdämpare, injektionssystem.

— Separationskolonner (tillverkare, all information om kolonnernas karakteristika, som porstorlek, typ av separationsmaterial osv., antal, längd och inbördes ordning på använda kolonner).

— Antal teoretiska nivåer i kolonnen eller kolonnkombinationen, separationseffektivitet (systemupplösning).

— Information om topparnas symmetri.

— Kolonntemperatur, typ av temperaturövervakning.

— Detektor (mätprincip, typ, kuvettvolym).

— Flödesmätare om sådan används (tillverkare, mätprincip).

— System för registrering och bearbetning av data (hårdvara och mjukvara).

2.2.3 **Systemkalibrering**

— Detaljerad beskrivning av den metod som används för konstruktion av kalibreringskurvan.

— Information om kvalitetskriterier för den aktuella metoden (t.ex. koordinationskoefficient, kvadraternas summeringsfel osv.).

— Information om all extrapolering, alla antaganden och approximeringar gjorda under experimentproceduren samt om bedömning och bearbetning av data.

— Alla mätningar som gjorts för konstruktion av kalibreringskurvan ska dokumenteras i en tabell som inkluderar följande information för varje kalibreringspunkt:

  — Provets namn.

  — Provets tillverkare.

  — Karakteristikvärden för standardämnena M_p, M_n, M_w, M_w/M_n, enligt tillverkaren eller från efterföljande mätningar, tillsammans med detaljerade uppgifter om bestämningsmetoden.

  — Insprutningsvolym och insprutningskoncentration.

▼B

— M_p-värde för kalibrering.

— Elueringsvolym eller korrigerad retentionstid mätt vid maximalt toppvärde.

— M_p beräknat vid maximalt toppvärde.

— Procentfel för beräknat M_p och kalibreringsvärde.

2.2.4 **Bedömning**

— Bedömning på tidsbasis: metoder som används för att säkerställa önskad reproducerbarhet (korrektionsmetod, intern standard osv.).

— Information om huruvida bedömningen gjorts på basis av elutionsvolymen eller retentionstiden.

— Information om gränserna för bedömningen, om ett toppvärde inte analyserats fullständigt.

— Beskrivning av utjämningsmetoder, om sådana används.

— Beredning av och förbehandlingsprocedurer för provet.

— Närvaro av oupplösta partiklar, om sådana förekommit.

— Injektionsvolym (µl) och injektionskoncentration (mg/ml).

— Anmärkningar om effekter som lett till avvikelser från den ideala GPC-profilen.

— Detaljerad beskrivning av alla ändringar i provningsförfarandet.

— Detaljerade uppgifter om felområden.

— All övrig information och anmärkningar relevanta för tolkningen av resultatet.

3. **HÄNVISNINGAR**

1. DIN 55672 (1995), Gelégenomträngningskromatografi (GPC) med tetrahydrofuran (THF) som elutionsmedel, del 1.

2. Yau, W.W., Kirkland, J.J., och Bly, D.D. eds. (1979), Modern Size Exclusion Liquid Chromatography, J. Wiley and Sons. (ung. Modern vätskeuteslutningskromatografi för uteslutning)

3. ASTM D 3536-91, (1991), Standardmetod för analys av medelmolekylvikter och molekylviktfördelning med vätskeuteslutningskromatografi (gelégenomträngningskromatografi – GPC). American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

4. ASTM D 5296-92, (1992), Standardmetod för analys av medelmolekylvikter och molekylviktfördelning i polystyren med storleksseparationskromatografi. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

▼B

Bilaga

Exempel på andra metoder för fastställande av medelantalet molekylvikt (M_n) för polymerer

Gelégenomträngningskromatografi (GPC) är den metod som är att föredra för fastställande av M_n, framför allt när en uppsättning standardämnen finns tillgängliga, vilkas struktur är jämförbar med polymerens struktur. När det föreligger praktiska svårigheter med användning av GPC eller det redan finns en förväntan att ämnet inte kommer att uppfylla ett vanligt M_n-kriterium (och detta kräver bekräftelse) finns alternativa metoder, som t.ex.:

1. **Utnyttjande av kolligativa egenskaper**

1.1 Ebullioscopi/kryoscopi

inkluderar mätning av kokpunktshöjning (ebullioscopi) eller fryspunktssänkning (cryoscopi) för ett lösningsmedel när polymeren tillsätts. Metoden grundas på det faktum att den upplösta polymerens effekt på vätskans kok- och/eller fryspunkt beror på polymerens molekylvikt (1) (2).

Tillämpningsbarhet: $M_n < 20\,000$.

1.2 Sänkning av ångtryck

inkluderar mätning av ångtrycket för en vald referensvätska före och efter tillsats av kända mängder polymerer (1) (2).

Tillämpningsbarhet: $M_n < 20\,000$ (teoretiskt, i praktiken emellertid ett begränsat värde).

1.3 Membranosmometri

grundas på osmosprincipen, dvs. den naturliga tendensen för molekylerna i en lösning att passera genom ett halvgenomträngligt membran från en lösning till en koncentrerad lösning för att uppnå balans. I detta prov har den uppblandade lösningen nollkoncentration, medan den koncentrerade lösningen innehåller polymeren. Lösningens passage genom membranet förorsakar ett differenstryck som är avhängigt koncentrationen och polymerens molekylvikt (1) (3) (4).

Tillämpningsbarhet: $M_n < 20\,000$–$200\,000$.

1.4 Ångfasosmometri

inkluderar jämförelse av förångningshastigheten för en ren aerosollösning till minst tre aerosoler innehållande polymeren vid olika koncentrationer (1) (2) (4).

Tillämpningsbarhet: $M_n < 20\,000$.

▼B

2. **Ändgruppanalys**

För att kunna använda denna metod krävs kunskap både om polymerens övergripande struktur och om den typ av kedja som avslutar ändgrupperna (som måste vara urskiljningsbar från huvudstrukturen med t.ex. NMR eller titrering/derivatisering) Fastställandet av molekylkoncentrationen i polymerens ändgrupper kan ge ett värde for rnolekylvikten (7) (8) (9).

Tillämpningsbarhet: M_n upp till 50 000 (med minskande tillförlitlighet).

3. **Hänvisningar**

1. Billmeyer, F.W. Jr., (1984), Textbook of Polymer Science (ung. Textbok om polymerforskning), tredje utg., John Wiley, New York.

2. Glover, C.A., (1975), Absolute Colligative Property Methods (ung. Absoluta metoder för bestämning av kolligativa egenskaper), kapitel 4, In: Polymer Molecular Weights (ung. Polymerers molekylvikt), Part I P.E. Siade, 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 (ung. Standardmetod för bestämning av numerisk medelmolekylvikt med membranosmometri i polymerer). American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

4. Coll, H. (1989), Membrane Osmometry (Membranosmometri). In: Determination of Molecular Weight (Bestämning av molekylvikt), A.R. Cooper ed., J. Wiley and Sons, s. 25–52.

5. ASTM 3592-77, (1977), Standard Recommended Practice for Determination of Molecular Weight by Vapour Pressure (ung. Rekommenderad standardmetod för bestämning av molekylvikt med hjälp av ångtryck), American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

6. Morris, C.E.M., (1989), Vapour Pressure osmometry (Ångtrycksosmometri). In: Determination of Molecular Weight (Bestämning av molekylvikt), A.R. Cooper ed., John Wiley and Sons.

7. Schröder, E., Muller, G., och Arndt, K-F., (1989), Polymer Characterisation (Polymerkarakterisering), Carl Hanser Verlag, München.

8. Garmon, R.G., (1975), End-Group Determinations (ung. Bestämning av ändgrupper) kapitel 3 In: Polymer Molecular Weights (Polymerers molekylvikt), Del 1, P.E. Siade, Jr. ed., Marcel Dekker, New York.

9. Amiya, S., et al. (1990), Pure and Applied Chemistry (ung. Ren och tillämpad kemi), 62, 2139–2146.

▼B

A.19 INNEHÅLL AV LÅGMOLEKYLVIKTSPOLYMERER

1. METOD

Denna kromatografiska metod (genomträngning i gelé) är en kopia på OECD TG 119 (1996). Grundläggande principer och annan teknisk information finns i hänvisningarna.

1.1 INLEDNING

Eftersom polymerernas egenskaper är så varierande är det omöjligt att beskriva en enda metod som ger exakta förhållanden för separation och bedömning som täcker alla eventualiteter och särskilda företeelser vid separation av polymerer. Särskilt komplexa polymera system är ofta inte mottagliga för kromatografisk analys av genomträngning i gelé (GPC). När GPC inte är praktiskt genomförbart kan den molekylära vikten fastställas med andra metoder (se bilaga). I sådana fall ska fullständig information om och motivering för den använda metoden anges.

Den beskrivna metoden grundas på DIN-standard 55672 (1). Detaljerad information om hur experimentet ska utföras och hur datan ska bedömas finns i denna DIN-standard. Om experimentförhållandena måste ändras, ska dessa förändringar motiveras. Andra standarder får tillämpas om full hänvisning därtill görs. I den beskrivna metoden används polystyrenprover med känd polydispertion för kalibrering, som kan behöva anpassas till vissa polymerer, t.ex. vattenlösliga och anpassade polymerer med långa molekylkedjor.

1.2 DEFINITIONER OCH ENHETER

Låg molekylvikt definieras som en molekylvikt under 1 000 dalton.

Den numerära medelmolekylvikten M_n och den viktmässigt molekylära medelvikten M_w fastställs med följande ekvationer:

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

där:

H_i = är nivån på detektorsignalen från baslinjen för den kvarhållna volymen V_i,

M_i = är polymerfraktionens molekylvikt vid den kvarhållna volymen V_i, och n är antalet datapunkter.

Bredden på den molekylära viktfördelningen, som är ett mått på systemdispertionen, fås med förhållandet M_w/M_n.

▼B

1.3 REFERENSÄMNEN

Eftersom GPC är en relativ metod måste kalibrering göras. Normalt används tätt fördelad, linjärt konstruerad standardpolystyren med känd medelmolekylvikt M_n och M_w och en känd molekylviktfördelning för detta ändamål. Kalibreringskurvan kan bara användas för fastställande av molekylvikten för det okända provet om separationsförhållandena för provet och standardämnena valts på exakt samma sätt.

Det fastställda förhållandet mellan molekylvikten och urlakningsvolymen gäller enbart under det aktuella experimentets specifika förhållanden. Dessa förhållanden omfattar framför allt temperatur, lösning eller lösningsblandning, kromatografiska förhållanden och separationskolonn eller kolonnsystem.

Den molekylvikt som fastställs för provet på detta sätt utgörs av relativa värden och beskrivs som polystyrenets molekylära ekvivalensvikt. Detta innebär att molekylvikterna, beroende på struktur och kemisk skillnad mellan provet och standardämnet, kan avvika från absoluta värdena i större eller mindre utsträckning. Om andra standardämnen används, t.ex. polyetylenglykol, polyetylenoxid, polymetylmetakrylat, polyakrylsyra ska skälet därtill anges.

1.4 PRINCIPEN FÖR PROVNINGSMETODEN

Både provets molekylviktfördelning och medelmolekylvikter (M_n, M_w) kan fastställas med hjälp av GPC. GPC är en särskild typ av vätskekromatografi där provet separeras beroende på de enskilda komponenternas hydrodynamiska volymer (2).

Separationen utförs när provet passerar genom en kolonn fylld med poröst material, vanligtvis en organisk gelé. Små molekyler kan passera igenom porerna medan stora molekyler kvarhålls. De stora molekylernas passage blir därför kortare och dessa tas bort först. Medelstora molekyler passerar genom en del av porerna och/eller elueras senare. De minsta molekylerna, med en hydrodynamisk medelradie mindre än porerna i gelén, kan passera genom samtliga porer. Dessa elueras då sist.

I idealsituationen styrs separeringen helt och hållet av molekylstorleken, men i praktiken är det svårt att förhindra att åtminstone en viss absorbtionseffekt inverkar störande. Ojämn packning i kolonnen och döda volymer kan förvärra situationen (2).

Detektionen utförs med t.ex. reflektionsindex eller UV-absorbtion och ger en enkel fördelningskurva. För att kunna tillskriva kurvan den faktiska molekylvikten måste kolonnen kalibreras genom att polymerer med känd molekylvikt och helst i stort sett liknande struktur, t.ex. olika standardpolysterener, tillåts passera genom kolonnen. Normalt fås en typisk Gaus-kurva, ibland utdragen i en mindre svans på sidan för den låga molekylvikten, om de vertikala axlarna anger mängden, i förhållande till vikten, för de olika molekylvikter som elueras, och den horisontella axeln står för den logaritmiska molekylvikten.

▼B

Innehållet med låg molekylvikt härleds från denna kurva. Beräkningen kan bara bli korrekt om innehållet av lågmolekylviktarter är jämnt fördelat i polymermassan.

1.5 KVALITETSKRITERIER

Repeterbarheten (relativ standardavvikelse: RSD) för elutionsvolymen ska vara bättre än 0,3 %. Nödvändig repeterbarhet för analysen måste säkerställas genom korrigering enligt intern standard om ett kromatogram bedöms vara tidsberoende och inte omfattas av ovannämnda kriterier (1). Spridningen beror på standardämnets molekylvikt. Följande värden är typiska för standardpolystyren:

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

(M_p är standardämnets molekylvikt vid toppvärdet.)

1.6 BESKRIVNING AV PROVNINGSMETODEN

1.6.1 **Beredning av lösningar med standardpolystyren**

Standardpolystyrenen löses noggrant genom blandning i vald eluent. Hänsyn måste tas till tillverkarens rekommendationer vid beredning av lösningarna.

Koncentrationen av de standardämnen som väljs beror på olika faktorer, t.ex. injektionsvolym, lösningsviskositet och den analytiska detektorns känslighet. Maximal injektionsvolym måste anpassas till kolonnens längd för undvikande av överbelastning. Typiska injektionsvolymer for analytiska separationer med GPC och en kolonn på 30 cm × 7,8 mm ligger mellan 40 och 100 µl. Större volymer kan användas men bör inte överstiga 250 µl. Det optimala förhållandet mellan injektionsvolvm och koncentration måste fastställas innan kolonnen kalibreras.

1.6.2 **Beredning av provlösningen**

I princip gäller samma krav för beredning av provlösning. Provet löses upp i lämpligt lösningsmedel, t.ex. tetrahydrofuran (THF), genom omsorgsfull skakning. Det får under inga omständigheter lösas upp i ultraljudsbad. Vid behov kan provlösningen renas genom ett membranfilter, med en finhet på mellan 0,2 och 2 µm.

Förekomst av oupplösta partiklar måste registreras i slutrapporten, eftersom dessa kan bero på högviktsmolekyler. Lämplig metod ska användas för fastställande av viktandelen oupplösta partiklar. Lösningen bör användas inom 24 timmar.

▼B

1.6.3 **Korrigering för innehåll av föroreningar och tillsatser**

Korrigering av artinnehållet av M < 1 000 för bidraget från närvarande icke-po! ymera specifika komponenter (t.ex. föroreningar och/eller tillsatser) krävs normalt, med mindre det uppmätta innehållet redan är mindre än 1 %. Detta fås genom direkt analys av polymerlösningen eller GPC-eluaten.

När eluaten efter passage genom kolonnen ska spädas för ytterligare analys, ska den vara koncentrerad. Det kan vara nödvändigt att evaporera eluaten till torrhet och lösa upp den igen. Eluatkoncentrationen ska göras under förhållanden som garanterar att inga förändringar uppstår i eluaten. Hanteringen av eluaten efter GPC-steget är beroende av den analysmetod som används för mängdbestämningen.

1.6.4 **Apparater**

GPC-apparater består av följande komponenter:

— Lösningsbehållare.

— Avluftningsapparat (när så krävs).

— Pump.

— Pulsdämpare (när så krävs).

— Injektionssystem.

— Kromatografikolonner.

— Detektor.

— Flödesmätare (när så krävs).

— Apparat för registrering/bearbetning av data.

— Avfallskärl.

Det måste säkerställas att GPC-systemet är inert avseende använda lösningsmedel, t.ex. genom användning av stålkapilär för THF-lösningen.

1.6.5 **Injektions- och lösningstillförselsystem**

En definierad volym av lösningsprovet fylls i kolonnen, antingen automatiskt eller manuellt, i en tydligt definierad zon. Alltför snabb utdragning eller intryckning av kolven i sprutan, om fyllningen sköts manuellt, kan förorsaka förändringar i den observerade molekylviktfördelningen. Systemet för tillförsel av lösning ska så långt möjligt vara pulsfritt, helst med inbyggd pulsdämpning. Flödeshastigheten ska vara ca 1 ml/min.

1.6.6 **Kolonn**

Polymeren kännetecknas, beroende på provet, antingen genom användning av enkel kolonn eller flera kolonner kopplade i serie. Ett antal porösa kolonnmaterial med definierade egenskaper, t.ex. porstorlek, exklutionsgränser osv. finns kommersiellt tillgängliga. Val av separationsgelé och kolonnlängd beror både på provets egenskaper (hydrodynamisk volym, molekylviktfördelning) och specifika förhållandena för separationen, som t.ex. lösning, temperatur och flödeshastighet (1) (2) (3).

▼B

1.6.7 **Teoretiska nivåer**

Den kolonn eller kolonnkombination som används för separationen måste karakteriseras av antalet teoretiska nivåer. Detta inkluderar, när THF används som elutionslösning, fyllning av en lösning av etylbensen eller annan lämplig icke-polär lösning i en kolonn med känd längd. Antalet teoretiska nivåer fås med följande ekvation:

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

eller,

N = är antalet teoretiska nivåer,

V_e = är elutionsvolymen vid toppvärdet,

W = är toppvärdets baslinjebredd, och

$W_{1/2}$ = är toppbredden vid halva höjden.

1.6.8 **Separationseffektivitet**

Förutom antalet teoretiska nivåer, som styr bandbredden, spelar också separationseffektiviteten, som bestäms av lutningen på kalibreringskurvan, en viss roll. Separationseffektiviteten för en kolonn fås med följande förhållande:

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

där:

$V_{e,\ M_x}$ = är elutionsvolymen för polystyren med molekylvikten M_x, och

$V_{e,(10M_x)}$ = är elutionsvolymen för polystyren med en tio gånger större molekylvikt.

Systemets upplösning definieras normalt som:

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

där:

V_{e1} och V_{e2} = är elutionsvolymerna för de två standardpolystyrenerna vid maximalt toppvärde,

W_1 och W_2 = är baslinjebredden vid toppvärde, och

M_1 och M_2 = är molekylvikten vid maximalt toppvärde (bör skilja sig åt med en faktor på 10).

R-värdet för kolonnsystemet bör vara större än 1,7 (4)

▼B

1.6.9 **Lösningsmedel**

Samtliga lösningsmedel måste ha hög renhet (för THF används en renhet på 99,5 %). Lösningsmedelsbehållaren, om nödvändigt i en inert gasatmosfär ska vara tillräckligt stor för kalibrering av kolonnen och flera provanalyser. Lösningsmedlet ska avgasas innan det via pumpen transporteras till kolonnen.

1.6.10 **Temperaturövervakning**

Temperaturen i de kritiska, interna komponenterna (injektionsslinga, kolonn, detektor och rörsystem) ska vara jämn och anpassad till valt lösningsmedel.

1.6.11 **Detektor**

Syftet med detektorn är att kvantitativt registrera koncentrationen i det prov som elueras från kolonnnen. För att undvika onödig breddning av toppvärden ska detektorcellens kuvettvolym hållas så liten som möjligt. Den bör inte vara större än 10 µl, utom for lattffyktiga och tunna detektorer. Differentialrefraktometri används vanligtvis för detektion. Om provets eller elutionslösningens särskilda egenskaper så kräver kan emellertid andra detektortyper användas, t.ex. UV/VIS, IR- eller viskositetsdetektorer osv.

2. **DATA OCH RAPPORTERING**

2.1 DATA

Detaljerade utvärderingskriterier och krav avseende insamling och bearbetning av data ska uppfylla kraven i DIN-standarden (1).

Två sinsemellan oberoende experiment ska utföras för varje prov. Experimenten ska analyseras individuellt. Det är alltid viktigt att också ta fram data från blankprover, behandlade på samma sätt som det verkliga provet.

Det är nödvändigt att uttryckligen ange att uppmätta värden är relativa värden, ekvivalenta mot molekylvikten för det standardämne som använts.

Efter fastställande av retentionsvolymerna eller retentionstiderna (eventuellt korrigerade med en intern standard), plottas log M_p-värdena (M_p är maximalt toppvärde för kalibreringsämnet) mot en av nämnda mängder. Minst två kalibreringspunkter krävs per tiotal molekylvikter och minst fem mätpunkter för den totala kurvan, som ska täcka provets uppskattade molekylvikt. Kalibreringskurvans ändpunkt för den låga molekylvikten definieras av n-hexylbenzen eller annan lämplig icke-polär lösning. Den del av kurvan som svarar mot molekylvikter under 1 000 bestäms och korrigeras för föroreningar och tillsatser efter behov. Elutionskurvorna bedöms i allmänhet med hjälp av elektronisk databehandling. Om manuell digitalisering används kan råd hämtas från ASTM D 3536-91 (3).

▼B

Om någon olöslig polymer blir kvar i kolonnen är dess molekylvikt troligen högre än den upplösta fraktionen och om hänsyn inte tas därtill kommer den; att ge en för hög bedömning av innehållet lågmolekylvikter. Riktlinjer för korrigering av innehållet av lågmolekylvikten för olöslig polymer ges i bilagan.

Fördelningskurvan ska presenteras i tabellform eller som ett diagram (differentialfrekvens eller summa procentandel mot log M). I den grafiska presentationen ska varje tiotal molekylvikter normalt ha en bredd på 4 cm, och maximalt toppvärde ska ligga på ungefär 8 cm höjd. Vid intregralfördelningskurvor ska skillnaderna mellan 0 och 100 % vara ungefär 10 cm.

2.2 PROVNINGSRAPPORT

Provningsrapporten ska innehålla följande information.

2.2.1 **Undersökt ämne**

— Tillgänglig information om det undersökta ämnet (identitet, tillsatser, föroreningar).

— Beskrivning av hanteringen av provet, anmärkningar, problem.

2.2.2 **Instrument**

— Eluentbehållare, inertgas, avgasning av eluenten, eluentens sammansättning, föroreningar.

— Pump, pulsdämpare, injektionssystem.

— Separationskolonner (tillverkare, all information om kolonnernas karakteristika, som porstorlek, typ av separationsmaterial osv., antal, längd och inbördes ordning på använda kolonner).

— Antal teoretiska nivåer i kolonnen eller kolonnkombinationen, separationseffektivitet (systemupplösning).

— Information om topparnas symmetri.

— Kolonntemperatur, typ av temperaturövervakning.

— Detektor (mätprincip, typ, kuvettvolym).

— —Flödesmätare om sådan används (tillverkare, mätprincip).

— System för registrering och bearbetning av data (hårdvara och mjukvara).

2.2.3 **Systemkalibrering**

— Detaljerad beskrivning av den metod som används för konstruktion av kalibreringskurvan.

▼B

— Information om kvalitetskriterier för den aktuella metoden (t.ex. koordinationskoefficient, kvadraternas summeringsfel osv.).

— Information om all extrapolering, alla antaganden och approximeringar gjorda under experimentproceduren samt om bedömning och bearbetning av data.

— Alla mätningar som gjorts för konstruktion av kalibrenngskurvan ska dokumenteras i en tabell som inkluderar följande information för varje kalibreringspunkt:

  — Provets namn.

  — Provets tillverkare.

  — Karakteristikvärden för standardämnena M_p, M_n, M_w och M_w/M_n, enligt tillverkaren eller från efterföljande mätningar, tillsammans med detaljerade uppgifter om fastställandemetoden.

  — Injektionsvolym och insprutningskoncentration.

  — M_p värde för kalibrering.

  — Elueringsvolym eller korrigerad retentionstid mätt vid maximalt toppvärde.

  — M_p beräknat vid maximalt toppvärde.

  — Procentfel för beräknat M_p och kalibreringsvärde.

2.2.4 **Information om innehåll av lågmolekylvikt i polymer**

— Beskrivning av de metoder som används för analys och hur experimentet utfördes.

— Information om andelen innehåll lågmolekylviktarter (w/w) för hela provet.

— Information om föroreningar, tillsatser och andra icke-polymera arter, som viktandel i förhållande till hela provet.

2.2.5 **Bedömning**

— Bedömning på tidsbasis: metoder som används för att säkerställa önskad reproducerbarhet (korrek tionsmetod, intern standard osv.).

— Information om huruvida bedömningen gjorts på basis av elutionsvolymen eller retentionstiden.

— Information om gränserna för bedömningen, om ett toppvärde inte analyserats fullständigt.

— Beskrivning av utjämningsmetoder, om sådana används.

— Beredning av och förbehandlingsprocedurer för provet.

— Närvaro av oupplösta partiklar, om sådana förekommit.

▼B

— Injektionsvolym (µ1) och injektionskoncentration (mg/ml).

— Anmärkningar om effekter som lett till avvikelser från den ideala GPC-profilen.

— Detaljerad beskrivning av alla ändringar i provningsförfarandet.

— Detaljerade uppgifter om felområden.

— All övrig information och anmärkningar relevanta för tolkningen av resultatet.

3. **HÄNVISNINGAR**

1. DIN 55672 (1995), Gelégenomträngningskromatografi (GPC) med tetrahydrofuran (THF) som elutionsmedel, del 1.

2. Yau, W.W., Kirkland, J.J., och Bly, D.D. eds. (1979), Modern Size Exclusion Liquid Chromato- graphy, J. Wiley och Sons. (ung. Modern vätskeuteslutningskromatografi för uteslutning).

3. ASTM D 3536-91, (1991), Standardmetod för analys av medelmolekylvikter och molekylviktfördelning med vätskeuteslutningskromatografi (gelégenomträngningskromatografi – GPC). American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

4. ASTM D 5296-92, (1992), Standardmetod för analys av medelmolekylvikter och molekylviktfördelning i polystyren med storleksseparationskromatografi. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

▼B

Bilaga

Riktlinjer för korrigering av lågmolekylärt innehåll beroende på närvaro av olöslig polymer

När olösliga polymerer förekommer i ett prov, leder detta till massaförlust under GPC-analysen. Den olösliga polymeren kvarhålls definitivt i kolonnen eller provfiltret, medan den lösbara delen av provet passerar genom kolonnen. När polymerens refraktiva indexökning (dn/dc) kan uppskattas eller mätas, kan provets massaförlust i kolonnen uppskattas. I detta fall görs en korrigering med hjälp av en extern kalibrering med standardmaterial med känd koncentration och dn/dc för kalibrering av refraktometerns reaktion. I nedanstående exempel används en standardpolymer (merylmetakrylat) (pMMA).

Vid den externa kalibreringen för analys av akrylpolymerer analyseras en standard-pMMA med känd koncentration i terahydrofuran med GPC, och resulterande data används för att få fram refraktometerkonstanten med följande ekvation:

$$K = R/(C \times V \times dn/dc)$$

där:

K = står för refraktometerkonstanten i μvs/ml,

R = för reaktionen på standard-pMMA i μvs,

C = för koncentrationen av standard-pMMA i mg/ml,

V = för insprutningsvolymen i ml, och

dn/dc = är ökningen av refrakdonsindexet för pMMA i tetrahydrofuran (i ml/mg).

Följande data är normala för en standard-pMMA:

R = 2 937 891

C = 1,07 mg/ml

V = 0,1 ml

dn/dc = 9×10^{-5} ml/mg

Resulterande K-värde, $3{,}05 \times 10^{11}$, används därefter för att beräkna den teoretiska detektorreaktionen, om 100 % av den insprutade polymeren hade eluerat genom detektorn.

▼B

A.20 **POLYMERERS BETEENDE I VATTEN VID LÖSNING/EXTRAKTION**

1. **METOD**

Den beskrivna metoden är en kopia av en reviderad version av OECD TG 120 (1997). Ytterligare teknisk information finns i hänvisning 1.

1.1 INLEDNING

För vissa polymerer, som t.ex. emultionspolymerer, kan visst inledande förberedande arbete krävas innan nedanstående metod kan användas. Metoden är inte tillämplig på flytande polymerer och på polymerer som under provningsförhållandena reagerar med vatten.

När metoden inte är praktisk eller möjlig kan beteendet vid lösning/extraktion undersökas med andra metoder. I så fall ska fullständiga detaljer och motivering för den använda metoden anges.

1.2. REFERENSÄMNEN

Inga.

1.3. UNDERSÖKNINGSMETODENS PRINCIP

Polymerernas beteende vid lösning/extraktion i vatten fastställs med flaskmetoden (se A.6 lösnings-barhet i vatten, flaskmetod) med nedan beskrivna ändringar.

1.4. KVALITETSKRITERIER

Inga,

1.5. BESKRIVNING AV UNDERSÖKNINGSMETODEN

1.5.1 **Utrustning**

Följande utrustning krävs för denna metod:

— Krossanordning, t.ex. kvarn för produktion av partiklar med känd storlek.

— Apparater för skakning med möjlighet till temperaturövervakning.

— Membranfiltersystem.

— Lämplig analysutrustning.

— Standardsil.

1.5.2 **Beredning av prover**

Ett representativt prov ska först reduceras till en partikelstorlek på mellan 0,125 och 0,25 mm med lämplig sil. Kylning kan krävas för provets stabilitet eller för malningsprocessen. Material med gummiliknande natur kan krossas vid temperaturen på flytande kvävgas (1).

Om den önskade partikelstorleksfraktionen inte kan skapas ska åtgärd vidtas för att i största utsträckning minska partikelstorleken och resultatet därav registreras. Det ska i rapporten anges på vilket sätt det krossade provet förvarats fram till undersökningen.

▼B

1.5.3 **Förfarande**

Tre prover på 10 g av det undersökta ämnet ska vägas i vart och ett av tre kärl försedda med glaspropp, och därefter ska 1 000 ml vatten tillsättas till varje kärl. Om hantering av 10 g polymer visar sig vara opraktiskt, ska den närmast högre mängd som kan hanteras användas och vattenvolymen justeras i enlighet därmed.

Kärlen ska tillslutas noggrant och därefter upphettas till 20 °C. En skak- eller omrörningsanordning som kan arbeta vid konstant temperatur ska användas. Efter en period på 24 timmar ska innehållet i varje kärl centrifugeras eller filtreras och polymerkoncentrationen i den klara vätskefasen fastställas med lämplig analysmetod. Om ingen lämplig analysmetod för vätskefasen finns kan den totala lösbarheten/extraktionsbarheten uppskattas utifrån filterrestens eller centrifugrestens torra vikt.

Det är vanligtvis nödvändigt att kvantitativt differentiera å ena sidan föroreningarna och tillsatserna och å andra sidan de med låg molekylvikt. Det är också viktigt att vid gravimetriskt fastställande göra ett blankprov utan undersökt ämne, för att kunna ta hänsyn till resterna från experimentet.

Polymerernas beteende vid lösning/extraktion i vatten vid 37 °C och pH 2 samt pH 9 kan fastställas på samma sätt såsom beskrivet för utförandet av experimentet vid 20 °C. pH-värdena kan erhållas genom tillsats av antingen lämplig buffert eller syra eller bas, som t.ex. saltsyra, ättiksyra, analytiskt natrium eller kaliumhydroxid eller NH_3.

En eller två undersökningar ska göras, beroende på vilken analysmetod som används. När tillräckligt specifika metoder finns för direktanalys av vätskefasen avseende polymerkomponenten, är det tillräckligt med en sådan undersökning som beskrivits här ovan. När sådana metoder inte finns tillgängliga och fastställande av polymerens beteende vid lösning/extraktion begränsas till indirekt analys, genom fastställande enbart genom det totala innehållet organiskt kol (TOC) i vätskeextraktet, ska ytterligare en undersökning göras. Denna kompletterande undersökning ska också göras på tre prover, med tio gånger mindre polymer och samma mängd vatten som använts vid den första undersökningen.

1.5.4 **Analys**

1.5.4.1 *Undersökningar utförda med en provstorlek*

Det kan finnas metoder tillgängliga för direktanalys av polymerkomponenter i vätskefasen.

Alternativt kan eventuellt också indirekt analys av upplösta/extraherade polymerkomponenter, genom fastställande av det totala innehållet upplösningsbara delar och korrigering för ej polymerspecifika komponenter, göras.

Analys av vätskefasen avseende totala polymeriska arter är möjlig antingen genom tillräckligt känslig metod, t.ex.:

— TOC med hjälp av persulfat- eller dikromatupplösning för att producera CO_2, följt av uppskattning med IR-analys eller kemisk analys,

▼B

— Atomabsorbtionsspektrometri (AAS) eller dess induktivt kopplade plasmautsläpp (ICP) motsvarande den för kisel- eller metallinnehållande polymerer,

— UV-absorbtion eller spektrofluorimetri för akrylpolymerer,

— LC-MS för lågmolekylviktsprover,

eller genom vakuumevaporation till torrhet av vätskeextraktet och spektroskopisk analys IR, UV, osv.) eller AAS/ICP-analys av resten.

Om analys av vätskefasen som sådan inte är praktiskt genomförbar, ska vätskeextraktet extraheras med ett vattenoupplösligt organiskt lösningsmedel, t.ex. klorerat kolväte. Lösningsmedlet evaporeras därefter och resten analyseras enligt ovan avseende angivet polymerinnehåll. Komponenter i denna rest som identifieras som föroreningar eller tillsatser ska subtraheras för bestämning av polymerens egen upplösning/extraktion.

När förhållandevis stora mängder sådant material finns närvarande, kan det vara nödvändigt att analysera resterna, t.ex. HPLC- eller GC-analys för att differentiera föroreningarna från monomera och monomerderiverade ämnen, så att det faktiska innehållet av det senare kan fastställas.

I vissa fall kan vanlig evaporation av det organiska lösningsmedlet till torrhet och vägning av den torra resten vara tillräckligt.

1.5.4.2 *Provning med två olika provstorlekar*

Alla vätskeextrakt analyseras avseende total mängd organiskt kol.

Gravimetrisk bestämning ska göras på den oupplösta/ej extraherade delen av provet. Om polymer-resten, efter centrifugering eller filtrering av innehållet i varje kärl, sitter kvar på kärlväggen, ska kärlet sköljas med filtratet tills kärlet är rent från alla synliga rester. Därefter ska filtratet återigen centrifugeras eller filtreras. Kvarvarande rester på filtret eller i centrifugröret torkas vid 40 ^{o}C under vakuum och vägs. Torkningen ska fortsätta tills konstant vikt nås.

2. **DATA**

2.1 PROVNING MED EN ENDA PROVSTORLEK

De enskilda resultaten för var och en av de tre flaskorna samt medelvärdena ska anges och uttryckas i enheter för massa/volym lösning (normalt mg/l) eller massa/massa av polymerprovet (normalt mg/g). Dessutom ska provets viktförlust anges, beräknad som lösningens vikt dividerad med det ursprungliga provets vikt. Den relativa standardavvikelsen ska beräknas. Enskilda värden ska ges för hela ämnet (polymer plus väsentliga tillsatser osv.) och för polymeren ensam (dvs. efter subtraktion av bidraget från sådana tillsatser).

▼B

2.2 PROVNING MED TVÅ OLIKA PROVSTORLEKAR

De enskilda värdena för total mängd organiskt kol i vätskeextrakten för de två trippelexperimenten och medelvärdet för varje experiment ska anges, uttryckt som massa per volym lösning (normalt mg C/l), samt som massa per vikt för det ursprungliga provet (normalt mg C/g).

Om ingen skillnad föreligger mellan resultaten för stort respektive litet förhållande mellan prov och vatten, kan detta innebära att alla extraherbara komponenter faktiskt extraherats. I sådana fall krävs normalt ingen direkt analys.

Resternas individuella vikter ska anges och uttryckas i procent av provernas initialvikt. Medelvärden ska beräknas för varje experiment. Skillnaderna mellan 100 och funnen procentandel representerar andelen lösningsbart och extraherbart material i ursprungsprovet.

3. **RAPPORT**

3.1 PROVNINGSRAPPORT

Provningsrapporten ska innehålla följande information:

3.1.1 **Undersökt ämne**

— Tillgänglig information om ämnet, identitet, tillsatser, föroreningar, innehåll av varianter med låg molekylvikt.

3.1.2 **Experimentella förhållanden**

— Beskrivning av tillämpat förfarande och experimentella förhållanden.

— Beskrivning av analys- och detektionsmetoder.

3.1.3 **Resultat**

— Resultatet avseende lösningsbarhet/extraktionsbarhet i mg/l, individuella värden och medelvärden för extraktionsprovet för de olika lösningarna, uppdelat i polymerinnehåll och föroreningar, tillsatser osv.

— Resultatet av upplösningen/extraktionen av polymeren i mg/g.

— Värden för det totala innehållet organiskt kol i vätskeextrakten, lösningens vikt och beräknade andel, om denna mäts.

— pH-värde för varje prov.

— Information om blankvärden.

— Vid behov hänvisningar till det undersökta ämnets kemiska instabilitet, både under provnings- och analysprocessen.

— All information som är viktig för tolkningen av resultaten.

4. **HÄNVISNINGAR**

1. DIN 53733 (1976), Provtagning från plastprodukter för provningsändamål.

▼B

A.21 **OXIDERANDE EGENSKAPER (VÄTSKOR)**

1. **METOD**

1.1 INLEDNING

Denna provningsmetod är utformad för att mäta ett flytande ämnes potential att öka förbränningshastigheten eller förbränningsintensiteten hos ett brännbart ämne, eller att bilda en blandning med ett brännbart ämne som självantänds när de två blandas noggrant. Metoden är baserad på FN:s provningsmetod Provning för oxiderande vätskor (1) och är likvärdig med den. Då denna metod A.21 emellertid i första hand är utformad för att uppfylla kraven i förordning (EG) nr 1907/2006, krävs endast jämförelse med ett referensämne. Provning och jämförelse med ytterligare referensämnen kan bli nödvändiga om provningsresultaten förväntas användas för andra syften ([1]).

Denna provning behöver inte utföras när en undersökning av strukturformeln kan fastställa att ämnet utan rimligt tvivel är oförmöget att reagera exotermiskt med ett brännbart material.

Det är värdefullt att ha förhandsinformation om ämnets alla möjliga explosiva egenskaper innan denna provning utförs.

Denna provning är inte tillämplig på fasta ämnen, gaser, explosiva eller mycket brandfarliga ämnen, eller peroxider.

Denna provning behöver eventuellt inte utföras, om resultat för provsubstansen ifråga från provning enligt FN:s Provning för oxiderande vätskor (1) redan finns tillgängliga.

1.2 DEFINITIONER OCH ENHETER

Med ”medeltid för tryckstegring” avses medelvärdet av de uppmätta tiderna för att en blandning vid provning ska åstadkomma en tryckökning från 690 kPa till 2 070 kPa över det atmosfäriska trycket.

1.3 REFERENSÄMNE

65 % (viktprocent) salpetersyra (analysgrad) ska användas som referensämne. ([2])

([1]) Såsom, till exempel, inom ramen för FN:s transportföreskrifter.
([2]) Såsom, till exempel, inom ramen för FN:s transportföreskrifter.

▼B

Om den som utför försöken förutser att resultaten från denna provning eventuellt kommer att användas för andra syften ([1]), kan även provning med ytterligare referensämnen vara lämpligt ([2]).

1.4 PRINCIPEN FÖR PROVNINGSMETODEN

Vätskan som ska provas blandas med fibercellulosa, i ett viktförhållande 1 till 1, och införs i ett tryckkärl. Om vid blandning eller fyllning självantändning inträffar krävs ingen ytterligare provning.

Om självantändning inte inträffar ska hela provningen utföras. Blandningen upphettas i ett tryckkärl och medelvärdet fastställs för den tid det tar för trycket att stiga från 690 kPa till 2 070 kPa över det atmosfäriska trycket. Denna medeltid jämförs med medeltiden för trycket att stiga för en 1:1-blandning av referensämnet (-ämnena) och cellulosa.

1.5 KVALITETSKRITERIER

I en serie om fem försök med ett och samma ämne ska inget resultat avvika med mer än 30 % från det aritmetiska medelvärdet. Resultat som avviker med mer än 30 % från medelvärdet ska förkastas, tillvägagångssättet för blandning och fyllning förbättras och provningen upprepas.

1.6 BESKRIVNING AV METODEN

1.6.1 **Preparering**

1.6.1.1 *Brännbart ämne*

Torkad fibercellulosa med en fiberlängd mellan 50 och 250 μm och en medeldiameter av 25 μm ([3]), används som brännbart material. Den torkas tills vikten inte ändras, i ett lager som är högst 25 mm tjockt vid 105 °C under fyra timmar, och förvaras i en exikator med torkmedel tills den svalnat och ska användas. Vattenhalten i den torkade cellulosan ska vara mindre än 0,5 % av torrsubstansen ([4]). Om det behövs ska torktiden förlängas för att uppnå detta ([5]). Samma parti cellulosa ska användas under hela provningen.

([1]) Såsom, till exempel, inom ramen för FN:s transportföreskrifter.
([2]) I hänvisning 1 används t.ex. 50 % (viktprocent) perklorsyra och 40 % (viktprocent) natriumklorat.
([3]) T.ex. Whatmans kolonn kromatografiska cellulosapulver CF 11, katalognummer 4021 050.
([4]) Bekräftad genom (t.ex.) Karl-Fisher titrering.
([5]) Denna vattenhalt kan alternativt åstadkommas genom (t.ex.) uppvärmning vid 105 °C i vakuum under 24 timmar.

▼B

1.6.1.2 *Apparat*

1.6.1.2.1 Tryckkärl

Ett tryckkärl krävs. Kärlet består av ett cylindriskt tryckkärl som är 89 mm långt med en ytterdiameter av 60 mm (se figur 1). Två plana ytor bearbetas fram på motstående sidor (minskar kärlets tvärsnitt till 50 mm) för att underlätta fasthållning när tändstift och urluftningsplugg monteras. Kärlet som har en urborrning med en diameter av 20 mm har falsats på insidan i båda ändar till ett djup av 19 mm och gängats till 1”British Standard Pipe (BSP) eller metrisk motsvarighet. En tryckavlastare, i form av ett sidostycke, är inskruvad i den rundade delen av tryckkärlet 35 mm från ena änden och vinkelrätt mot de plana ytorna. Uttaget för detta borras till ett djup av 12 mm och gängas till 1/2” BSB (eller metrisk motsvarighet) för att passa till gängan på sidostyckets ände. Om så behövs kan en inert tätning anbringas för att se till att anslutningen blir gastät. Sidostycket sticker ut 55 mm från tryckkärlets huvuddel och har ett hål med en diameter av 6 mm. Sidostyckets ände är falsad och gängad för att passa en tryckgivare av membrantyp. Alla tryckmätningsanordningar kan användas under förutsättning att de inte påverkas av de heta gaserna eller upplösningsprodukterna och klarar att svara på tryckhöjningshastigheter motsvarande 690–2 070 kPa på mindre än 5 ms.

Tryckkärlets ände som är längst från sidostycket är förseglad med ett tändstift som är utrustat med två elektroder, den ena isolerad från och den andra ansluten till tändstiftets huvuddel. Den andra änden av tryckkärlet är förseglad med ett sprängbleck (sprängtryck cirka 2 200 kPa) som hålls på plats av en fästplugg med ett hål med en diameter av 20 mm. Om så behövs kan en inert tätning användas tillsammans med tändstiftet för att garantera en gastät anslutning. En stödställning (figur 2) håller enheten i rätt läge vid användning. Denna omfattar vanligen en gjutstålsplatta med måtten 235 mm × 184 mm × 6 mm och ett 185 mm långt fyrkantsrör 70 mm × 70 mm × 4 mm.

En sektion är bortskuren från motstående sidor i ena änden av fyrkantsrörets längd så att en struktur med två plansidiga ben som sticker ut från ett 86 mm långt helt fyrkantrör återstår. Ändarna på dessa plana sidor kapas av med en vinkel av 60° mot horisontalplanet och svetsas fast på bottenplattan. Ett urtag som är 22 mm brett och 46 mm djupt bearbetas fram på den ena sidan av den övre änden av fyrkantsröret, på så sätt att sidostycket passar in i urtaget när tryckkärlsenheten – med tändstiftsänden först – sänks ned i stödställningen. En stålbit som är 30 mm bred och 6 mm tjock svetsas fast på den undre inre sidan av fyrkantsröret för att fungera som en distans. Två 7 mm tumskruvar, gängade i motsatta sidor, håller tryckkärlet stadigt på plats. Två 12 mm breda band av 6 mm tjockt stål, svetsade på de sidobitar som sitter på fyrkantsrörets undre del, stödjer tryckkärlet från undersidan.

▼B

1.6.1.2.2 Tändsystem

Tändsystemet består av en 25 cm lång Ni/Cr-tråd med en diameter av 0,6 mm och ett motstånd av 3,85 ohm/m. Tråden är lindad, med hjälp av en 5 mm tjock stång, till formen av en spiral och är fastsatt vid tändstiftets elektroder. Spiralen ska ha ett av de utseenden som visas i figur 3. Avståndet mellan tryckkärlets undersida och undersidan av tändspiralen ska vara 20 mm. Om elektroderna inte går att justera ska tändtrådens ändar mellan spiralen och kärlets undersida isoleras med ett keramiskt överdrag. Tråden värms upp av en kraftkälla med konstant spänning som kan ge minst 10 A.

1.6.2 **Provningens utförande** ([1])

Apparaten, helt monterad med tryckgivare och uppvärmningssystem men utan sprängblecket på plats, stöds med tändstiftsänden nedåt. 2,5 g av den vätska som ska provas blandas med 2,5 g torkad cellulosa i dekanteringsglas med hjälp av en omrörningsstav av glas ([2]). För säkerhets skull ska blandningen utföras med en skyddsskärm mellan operatören och blandningen. Om vid blandning eller fyllning självantändning uppstår krävs ingen ytterligare provning. Blandningen tillsätts tryckkärlet i små portioner under knackning, så att blandningen säkert packas runt tändspiralen och är i god kontakt med den. Det är viktigt att spiralen inte förvrids under packningsprocessen då detta kan leda till oriktiga resultat ([3]). Sprängblecket sätts på plats och fästpluggen skruvas åt ordentligt. Det fyllda kärlet placeras, med sprängblecket överst, i stödställningen vilken ska stå i ett lämpligt, förstärkt dragskåp eller eldningsutrymme. Kraftförsörjningen ansluts till tändstiftets yttre anslutningar och 10 A läggs på. Tiden mellan det att blandningen påbörjas och inkopplingen av strömmen får inte överstiga 10 minuter.

Signalen som avges av tryckgivaren registreras med ett lämpligt system som möjliggör både utvärdering och alstring av en permanent dokumentering av den tidtrycksprofil som erhålls (t.ex. en transientregistrerare kopplad till en skrivare). Blandningen upphettas tills sprängblecket går sönder eller tills minst 60 s har gått. Om sprängblecket inte går sönder, ska man låta blandningen svalna innan man försiktigt demonterar apparaten, med vidtagande av försiktighetsåtgärder för att hantera eventuellt övertryck. Fem försök utförs med provämnet och referensämnet (-ämnena). Den tid det tar för trycket att stiga från 690 kPa till 2 070 kPa över det atmosfäriska trycket noteras. Medelvärdet för tryckstegringstiden beräknas.

I vissa fall kan ämnen alstra en tryckstegring (alltför snabb eller alltför långsam) som orsakas av kemiska reaktioner och som inte är relaterad till ämnets oxiderande egenskaper. I dessa fall kan det vara nödvändigt att upprepa provningen med ett inert ämne, t.ex. diatomit (kiselgur), i stället för cellulosa för att klargöra reaktionens natur.

([1]) Blandningar av oxidationsmedel och cellulosa ska behandlas som potentiellt explosiva och hanteras med försiktighet.

([2]) I praktiken kan detta åstadkommas genom att göra i ordning en 1:1-blandning av vätskan, som ska provas, och cellulosa i en större mängd än vad som behövs för försöket och överföra 5 ±0,1 g till tryckkärlet. Blandningen måste vara nygjord för varje försök.

([3]) Framför allt måste kontakt mellan spiralens på varandra följande varv undvikas.

▼B

2. **DATA**

Tryckstegringstiderna både för provämnet och referensämnet (-ämnena). Tryckstegringstiderna för provningarna med ett inert ämne, om sådana utförts.

2.1 BEHANDLING AV RESULTAT

Tryckstegringstiderna både för provämnet och referensämnet (-ämnena) beräknas.

Medelvärdet för tryckstegringstiderna för provningarna med ett inert ämne (om sådana utförts) beräknas.

I tabell 1 visas några exempel på resultat.

Tabell 1

Exempel på resultat [a]

Ämne [b]	Medeltryckstegringstid för en 1:1-blandning med cellulosa (ms)
Ammoniumdikromat, mättad vattenlösning	20 800
Kalciumnitrat, mättad vattenlösning	6 700
Järn(III)nitrat, mättad vattenlösning	4 133
Litiumperklorat, mättad vattenlösning	1 686
Magnesiumperklorat, mättad vattenlösning	777
Nickelnitrat, mättad vattenlösning	6 250
Salpetersyra, 65 %	4 767 [c]
Perklorsyra, 55 %	121 [c]
Perchloric acid, 55 %	59
Kaliumnitrat, 30 % vattenlösning	26 690
Silvernitrat, mättad vattenlösning	[d]
Natriumklorat, 40 % vattenlösning	2 555 [c]
Natriumnitrat, 45 % vattenlösning	4 133
Inert ämne	
Vatten: cellulosa	[d]

[a] Se hänvisning (1) för klassificering enligt FN:s transportsystem
[b] Mättade lösningar ska iordningställas vid 20 °C.
[c] Medelvärde från jämförande försök från flera laboratorier
[d] Det maximala trycket 2 070 kPa uppnåddes ej.

▼B

3. **RAPPORT**

3.1 PROVNINGSRAPPORT

Provningsrapporten ska omfatta följande information:

— Identiteten, sammansättningen, renheten, etc. för det ämne som provas.

— Provämnets koncentration.

— Torkprocessen för använd cellulosa.

— Vattenhalten för använd cellulosa.

— Resultatet av mätningarna.

— Resultatet från provningar med ett inert ämne, om sådana utförts.

— Det beräknade medelvärdet för tryckstegringstiden.

— Alla avvikelser från denna metod och orsaken till dem.

— All ytterligare information eller kommentarer som har betydelse för resultatets tolkning.

3.2 TOLKNING AV RESULTATET ([1])

Provningsresultaten har bedömts på grundval av

a) huruvida blandningen av provämne och cellulosa självantänder, och jämförelse av medelvärdet för den tid det tar för trycket att stiga från 690 kPa till 2 070 kPa

b) med respektive referensämne (-ämnen).

Ett flytande ämne anses vara ett oxidationsmedel om

a) en 1:1-blandning, i viktdelar, av ämnet och cellulosa självantänder, eller

b) en 1:1-blandning, i viktdelar, av ämnet och cellulosa uppvisar ett medelvärde för tryckstegringstiden som är mindre än eller lika med medelvärdet för tryckstegringstiden för en 1:1-blandning, i viktdelar, av 65 % (viktprocent) salpetersyra och cellulosa.

För att undvika falska positiva resultat ska, om så behövs, även de resultat som erhålls vid provning av ämnet med ett inert material beaktas då resultaten tolkas.

([1]) Se referens 1 för tolkning av resultaten enligt FN:s transportföreskrifter med användning av flera referensämnen.

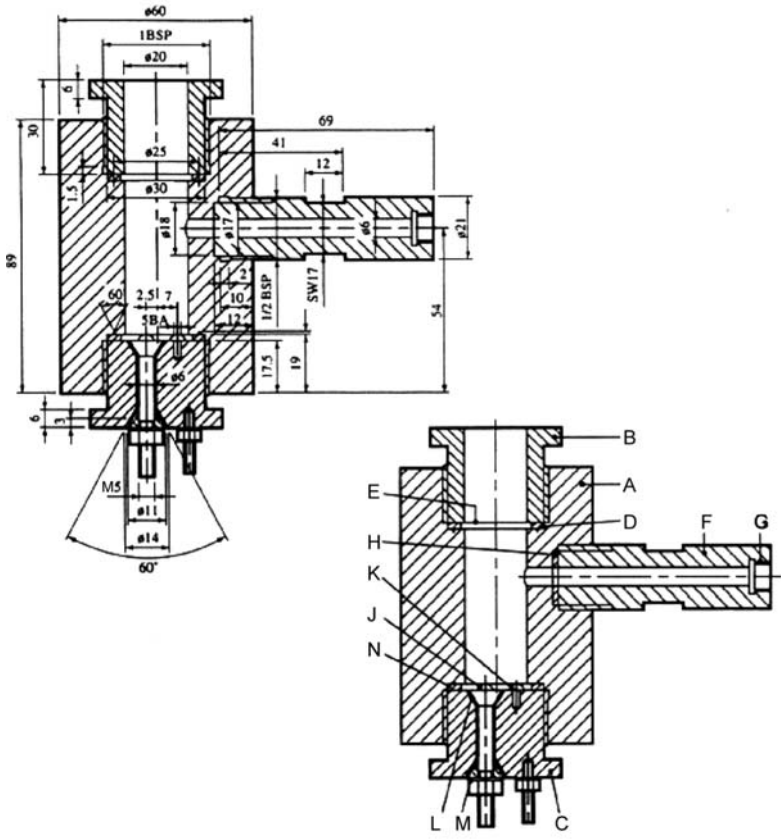
▼B

4. **HÄNVISNINGAR**

1. FN:s rekommendationer om transport av farligt gods, manual för provningar och kriterier. 3:e reviderade utgåvan. FN:s publikation nr: ST/SG/AC.10/1 l/rev. 3, 1999, sid. 342. Provning O.2: Provning för oxiderande vätskor.

Figur 1

Tryckkärl

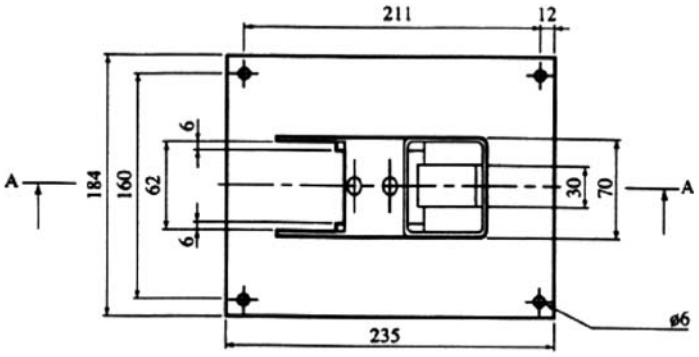


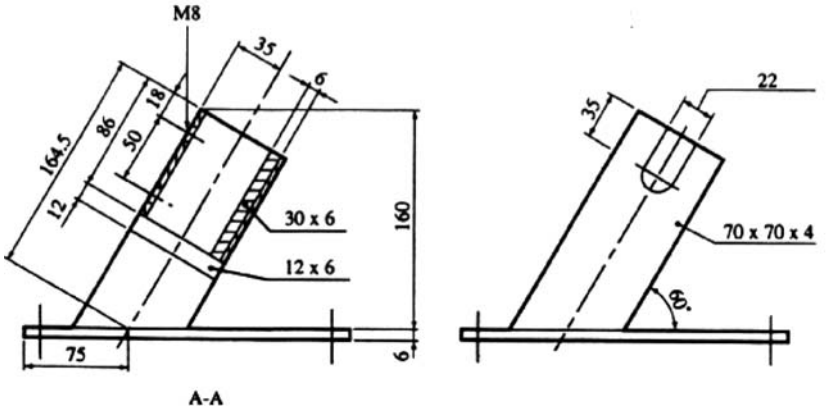
A. Tryckkärl, huvuddel	B. Fästplugg för sprängbleck	C. Tändstift
D. Mjuk blybricka	E. Sprängbleck	F. Sidostycke
G. Fäste för tryckgivare	H. Bricka	J. Isolerad elektrod
K. Jordad elektrod	L. Isolering	M. Stålkon
N. Tätningsspår för bricka		

▼B

Figur 2

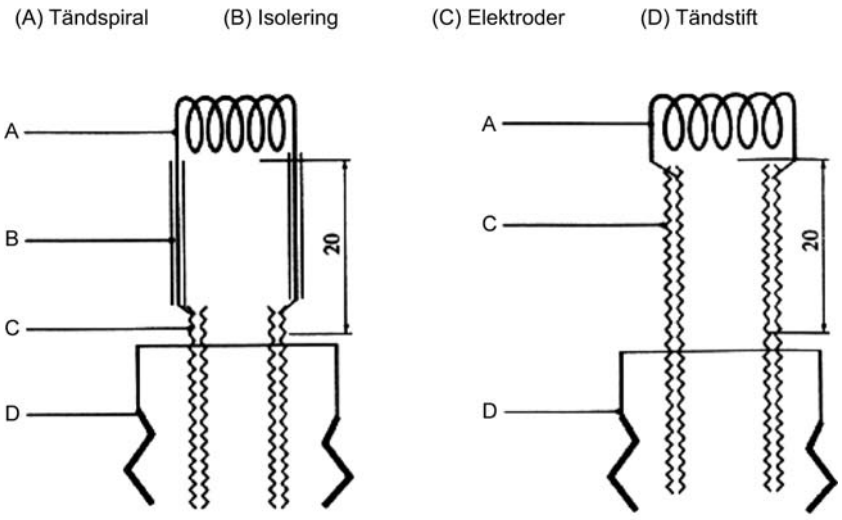
Stödställning





Figur 3

Tändsystem



Anm.: Endera av de här systemen kan användas.

▼M1

A.22. BESTÄMNING AV FIBRERS LÄNGDVIKTADE GEOMETRISKA MEDELDIAMETER

1. METOD

1.1 INLEDNING

I det här dokumentet beskrivs en metod för bestämning av den längdviktade geometriska medeldiametern (nedan ”medeldiametern”) hos syntetiska oorganiska fibrer som bulkmaterial. Eftersom medeldiametern i populationen med 95 procents sannolikhet ligger mellan konfidensgränserna i ett 95-procentigt konfidensintervall (medeldiametern ±2 medelfel) i stickprovet, kommer det rapporterade värdet (testvärdet) att bli den undre gränsen i konfidensintervallet (dvs. medeldiametern minus 2 medelfel). Metoden grundas på en uppdatering (från juni 1994) av ett metodförslag (HSE industry procedure) som antogs vid ett möte mellan ECFIA (European Ceramic Fibres Industry Association) och den brittiska arbetsmiljömyndigheten HSE (Health and Safety Executive) i Chester den 26 september 1993. Den har utvecklats för och utifrån en andra provningsjämförelse mellan laboratorier (1) (2). Mätmetoden kan användas för att bestämma fiberdiametern hos ämnen eller produkter i bulk som innehåller syntetiska oorganiska fibrer, t.ex. eldfasta keramiska fibrer, syntetiska glasartade fibrer eller kristallina och polykristallina fibrer.

Längdviktning är ett sätt att kompensera för den effekt på diameterfördelningen som uppkommer genom att långa fibrer bryts vid provtagning eller hantering av materialet. Det geometriska medelvärdet används för att beskriva diameterfördelningen för syntetiska oorganiska fibrer, eftersom dessa diametrar vanligen kan approximeras med en log-normalfördelning.

Att mäta såväl längden som diametern är både omständligt och tidskrävande, men om man endast mäter de fibrer som korsas eller tangeras av en oändligt tunn linje i ett SEM-synfält är sannolikheten för att man väljer en viss fiber proportionell mot dess längd. Eftersom längden i längdviktade beräkningar kan hanteras på detta sätt är det endast diametern som behöver mätas. Medeldiametern minus 2 medelfel kan sedan beräknas enligt nedan.

1.2 DEFINITIONER

Partikel: Ett föremål med ett längdbreddförhållande som är mindre än 3:1.

Fiber: Ett föremål med ett längdbreddförhållande på minst 3:1.

1.3 TILLÄMPNINGSOMRÅDE OCH BEGRÄNSNINGAR

Metoden är utformad för bestämning av diameterfördelningar med mediandiametrar från 0,5 till 6 μm. Vid mätning av större diametrar kan man använda mindre SEM-förstoringar, men metoden blir alltmer begränsad när man bestämmer storleksfördelningen hos finare fibrer. Om mediandiametern är mindre än 0,5 μm rekommenderas därför att ett transmissionselektronmikroskop (TEM) används.

▼M1

1.4 PRINCIP FÖR TESTMETODEN

Ett antal representativa kärnprov tas från fiberduken eller det löst bundna fibermaterialet. Fibrernas längd minskas genom krossning och ett representativt delprov dispergeras i vatten. Alikvoter extraheras och filtreras genom ett polykarbonatfilter med en porstorlek på 0,2 μm och bereds för undersökning med svepelektronmikroskop (SEM). Fibrernas diametrar mäts vid minst 10 000 gångers skärmförstoring ([1]) med hjälp av en ”linjeskärningsmetod”, vilket ger en objektiv uppskattning av mediandiametern. Den undre gränsen i ett 95-procentigt konfidensintervall (baserat på ett ensidigt test) beräknas för att få en uppfattning om det lägsta värdet på fibermaterialets geometriska medeldiameter.

1.5 BESKRIVNING AV TESTMETODEN

1.5.1 **Säkerhetsåtgärder**

För att begränsa exponeringen för luftburna fibrer till ett minimum bör torra fibrer hanteras i ett dragskåp eller en handskbox. Periodisk kontroll av exponeringen bör göras för att säkerställa att säkerhetsåtgärderna är effektiva. Vid hantering av syntetiska oorganiska fibrer bör engångshandskar användas för att minska hudirritationen och förhindra kontaminering.

1.5.2 **Apparatur och utrustning**

— Press (med en kapacitet på 10 MPa).

— Polykarbonatfilter med en porstorlek på 0,2 μm (25 mm diameter).

— Membranfilter av cellulosaester med en porstorlek på 5 μm som används som stödfilter.

— Filtreringsutrustning av glas (eller filtreringssystem för engångsbruk) för 25 mm filter (t.ex. Millipores glasutrustning för mikroanalys, artikelnr XX10 025 00).

— Nydestillerat vatten som filtrerats genom ett filter med en porstorlek på 0,2 μm för att avlägsna mikroorganismer.

— Sputter som belägger provet med en tunn film av guld eller guld/palladium.

— Svepelektronmikroskop med en upplösning på 10 nm som används vid 10 000 gångers förstoring.

— Spatlar, skalpellblad (nr 24), pincett, SEM-rör, kollim eller koltejp och silverlim.

— Ultraljudsstav eller ultraljudsbad.

— Kärnprovtagare eller korkborr för att ta prover tvärsigenom duken av syntetiska oorganiska fibrer.

([1]) Denna förstoring används för 3 μm fibrer. För 6 μm fibrer är det lämpligare att använda 5 000 gångers förstoring.

▼M1

1.5.3 **Testförfarande**

1.5.3.1 *Provtagning*

För duk, filt och matta används en 25 mm kärnprovtagare eller korkborr för att ta tvärsnittsprover (rätt genom materialet). Om endast en liten längd av duken är tillgänglig ska proverna vara jämnt fördelade längs dukens kortsida. Om större längder är tillgängliga ska proverna tas från slumpmässigt valda ställen. Samma utrustning kan användas för att ta stickprover från lösa fibrer. Om möjligt ska sex prover tas för att spegla variationen i bulkmaterialet.

De sex kärnproverna krossas vid 10 MPa i en press med 50 mm diameter. Materialet blandas därefter med en spatel och pressas igen vid 10 MPa. Materialet avlägsnas sedan från pressen och lagras i förslutna glasflaskor.

1.5.3.2 *Provberedning*

Om nödvändigt kan fiberproverna placeras i ugn vid 450 °C i en timme för att avlägsna organiskt bindemedel.

Dela upp provet i fyra lika stora delar med ”cone and quarter”-metoden (detta bör göras i ett dragskåp eller liknande).

Tillsätt med hjälp av en spatel en liten mängd (< 0,5 g) av provet till 100 ml nydestillerat vatten som har filtrerats genom ett 0,2 μm membranfilter (ultrarent vatten kan även framställas på annat sätt om det kan styrkas att det håller tillfredsställande kvalitet). Blanda om ordentligt med hjälp av en ultraljudsstav som körs vid 100 W och som ställts in så att en virvel uppkommer. (Gör på följande sätt om en ultraljudsstav inte finns att tillgå: skaka och vänd provbehållaren upprepade gånger i 30 sekunder, placera den därefter i ett ultraljudsbad i 5 minuter och skada och vänd sedan provbehållaren i ytterligare 30 sekunder.)

Ta omedelbart efter det att fibermaterialet dispergerats ett antal alikvoter av provet (t.ex. tre alikvoter på 3, 6 respektive 10 ml) med hjälp av en pipett med stor mynning (2–5 ml volym).

Vakuumfiltrera fibrerna från varje alikvot genom ett 0,2 μm polykarbonatfilter med ett 5 μm cellulosaesterfilter som stödfilter med hjälp av en filtrertratt av glas med cylindrisk behållare. Ca 5 ml filtrerat destillerat vatten tillsätts i tratten och alikvoten pipetteras långsamt ned i vattnet med pipettspetsen under vätskeytan. Pipett och behållare måste sköljas noga efter pipetteringen, eftersom fina fibrer har en tendens att ansamlas på ytan.

Avlägsna filtret försiktigt, skilj det från stödfiltret och lägg det i en behållare för att torka.

▼M1

Använd ett skalpellblad (nr 24) för att skära ut en fjärdedel eller hälften av filterkakan med en ”sågande rörelse”. Fäst försiktigt det utskurna partiet på svepelektronmikroskopets provhållare (stubbe) med hjälp av koltejp eller kollim. Stryk på silverlim på åtminstone tre ställen för att förbättra den elektriska kontakten vid filtrets och provhållarens kanter. Låt limmet torka. Sputtra därefter ca 50 nm guld eller guld/palladium på filterkakans yta.

1.5.3.3 *Kalibrering och användning av svepelektronmikroskopet*

1.5.3.3.1 Kalibrering

Svepelektronmikroskopets kalibrering måste kontrolleras minst en gång i veckan (helst varje dag) med hjälp av ett certifierat kalibreringsgrid. Kalibreringen ska kontrolleras med hjälp av en certifierad standard. Om det uppmätta värdet inte ligger inom ±2 % av det certifierade värdet måste svepelektronmikroskopets kalibrering justeras och kontrolleras igen.

Svepelektronmikroskopets ska ha en sådan upplösning att en diameter på 0,2 μm kan urskiljas vid en förstoring på 2 000 gånger i en matris av reella prov.

1.5.3.3.2 Användning

Svepelektronmikroskopet ska användas vid 10 000 gångers förstoring ([1]) och vid betingelser som ger goda resultat och en godtagbar bild vid låga svephastigheter, t.ex. 5 sekunder per bild. Även om inställningarna kan variera mellan olika svepelektronmikroskop bör man för att erhålla bästa skärpa och upplösning vid undersökning av material med låg atomvikt i allmänhet använda accelerationsspänningar på 5–10 keV, ett lågt värde på ”spot size” och ett kort arbetsavstånd. Vid användning av den linjära traversmetoden ska lutningen vara 0 grader för att minimera behovet av omfokusering. Om svepelektronmikroskopet har ett eucentriskt läge ska arbetsavståndet för detta användas. En lägre förstoring kan användas om materialet inte innehåller några små fibrer, dvs. om fiberdiametrarna är större än 5 μm.

1.5.3.4 *Storleksbestämning*

1.5.3.4.1 Undersökning av provet vid låg förstoring

Provet bör först undersökas vid låg förstoring för att se om det finns några tecken på att stora fibrer klumpat ihop sig och för att bestämma fibrernas täthet. Vid omfattande ihopklumpning rekommenderas att ett nytt prov bereds.

För att uppnå god statistisk noggrannhet är det nödvändigt att mäta ett visst minsta antal fibrer. Hög fibertäthet kan vara önskvärt, eftersom det är tidskrävande att undersöka tomma synfält och detta inte bidrar till analysen. Om filtrets fibertäthet är för hög blir det emellertid svårt att mäta alla mätbara fibrer och det finns risk för att man missar små fibrer, eftersom de kan döljas av större fibrer.

([1]) För 3 μm fibrer, se föregående fotnot.

▼M1

Om fibertätheten överstiger 150 fibrer per millimeter linjär travers kan det finnas risk för att medeldiametern överskattas. En låg fiberkoncentration ökar å andra sidan analystiden och det är därför ofta kostnadseffektivt att bereda ett prov vars fibertäthet ligger närmare den optimala tätheten än att fortsätta räkningen på filter med låg fiberkoncentration. Den optimala fibertätheten bör ge ett genomsnitt på en eller två räkningsbara fibrer per synfält vid 5 000 gångers förstoring. Den optimala tätheten beror emellertid på fibrernas storlek (diameter), så den som utför testet måste använda sin omdömesförmåga för att avgöra om fibertätheten ligger nära den optimala eller inte.

1.5.3.4.2 Längdviktning av fiberdiametrarna

Endast de fibrer som tangerar (eller korsar) en (oändligt) fin linje som dras på svepelektronmikroskopets skärm ska räknas. Av denna anledning dras en horisontell (eller vertikal) linje över skärmens mitt.

Alternativt kan en punkt placeras mitt på skärmen, varefter man inleder en kontinuerlig svepning i en riktning över filtret. Diametern mäts på alla fibrer med ett längdbreddförhållande som är större än 3:1 och som tangerar eller korsar denna punkt.

1.5.3.4.3 Storleksbestämning av fibrerna

Det rekommenderas att minst 300 fibrer mäts. Varje fiber ska endast mätas en gång, i den punkt där den skär den linje eller punkt som placerats på skärmen (eller nära skärningspunkten om fiberkanterna inte syns). För eventuella fibrer som inte har enhetliga tvärsnitt används en mätning motsvarande fiberns genomsnittliga diameter. Det är viktigt att noga bestämma var kanten befinner sig och mäta det kortaste avståndet mellan fiberkanterna. Storleksbestämningen kan göras antingen direkt eller på lagrade bilder eller foton. Användning av halvautomatiska mätsystem som laddar ned data direkt till ett kalkylprogram rekommenderas, eftersom man därigenom sparar tid och eliminerar risken för felskrivningar. Dessutom sker beräkningarna automatiskt.

Ändarna på långa fibrer bör undersökas vid låg förstoring för att kontrollera att de endast mäts en gång och inte kröker sig och kommer tillbaka in i synfältet.

2. **DATA**

2.1 BEHANDLING AV RESULTATEN

Fibrers diametrar är vanligen inte normalfördelade. Genom en logaritmisk transformation är det emellertid möjligt att erhålla en fördelning som närmar sig normalfördelningen.

Beräkna det aritmetiska medelvärdet (mean lnD) och standardavvikelsen (SD_{lnD}) för den naturliga logaritmen (lnD) av n fiberdiametrar (D).

$$\text{mean lnD} = \frac{\sum \text{lnD}}{n} \quad (1)$$

▼M1

$$SD_{lnD} = \sqrt{\frac{\Sigma(lnD - \text{mean } lnD)^2}{n - 1}} \quad (2)$$

Medelfelet (SE_{lnD}) beräknas genom att standardavvikelsen divideras med kvadratroten ur antalet mätningar (n).

$$SE_{lnD} = \frac{SD}{\sqrt{n}} \quad (3)$$

Beräkna det geometriska medelvärdet minus två geometriska medelfel (LWGMD – 2SE) genom att subtrahera två medelfel från medelvärdet och upphöja e till detta värde (medelvärdet minus två medelfel).

$$LWGMD - 2SE = e^{(\text{mean } lnD - 2SE_{lnd})} \quad (4)$$

3. **RAPPORTERING**

TESTRAPPORT

Testrapporten ska innehålla åtminstone följande information:

— Värdet på den längdviktade geometriska medeldiametern minus två medelfel.

— Eventuella avvikelser från metoden (särskilt sådana som kan påverka resultatens precision eller noggrannhet) samt skälen för dessa.

4. **LITTERATUR**

1. B. Tylee SOP MF 240. Health and Safety Executive. Februari 1999.

2. G. Burdett och 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 FÖRDELNINGSKOEFFICIENT (1-OKTANOL/VATTEN): METOD MED LÅNGSAM OMRÖRNING

INLEDNING

1. Den här testmetoden motsvarar OECD:s testriktlinje (TG) 123 (2006). Fördelningskoefficient 1-oktanol/vatten (P_{OW}) med log P_{OW}-värden upp till 8,2 har noggrant bestämts genom metoden med långsam omrörning (1). Den lämpar sig därför för direkt bestämning av P_{OW} för mycket hydrofoba ämnen.

2. Andra metoder för bestämning av fördelningskoefficienten 1-oktanol/vatten (P_{OW}) är ”skakkolvmetoden” (2), där P_{OW} bestäms utifrån retentionstiden vid HPLC-analys med omvänd fas (3). Skakkolvmetoden ger ofta upphov till artefakter beroende på att mikroskopiska droppar av oktanol övergår i vattenfasen. Med ökande värden på P_{OW} leder närvaron av dessa droppar i allt högre grad till att testämnets koncentration i vattnet överskattas. Metoden kan därför bara användas för ämnen med log $P_{OW} < 4$. Den andra metoden bygger på en tillförlitlig uppsättning direktbestämda P_{OW}-värden som används för att kalibrera förhållandet mellan retentionstiden med HPLC och de uppmätta P_{OW}-värdena. Det har funnits ett utkast till OECD-riktlinjer tillgängligt för bestämning av fördelningskoefficienten 1-oktanol/vatten för joniserbara ämnen (4), men detta ska inte längre användas.

3. Den här testmetoden har utvecklats i Nederländerna. Precisionen för de förfaranden som beskrivs här har validerats och optimerats genom interkalibrering med 15 deltagande laboratorier (5).

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN

Betydelse och användning

4. För inerta organiska ämnen har man funnit att det finns ett mycket tydligt samband mellan deras fördelningskoefficient 1-oktanol/vatten (P_{OW}) och deras bioackumulering i fisk. Det har dessutom konstaterats att det finns ett samband mellan kemikaliers P_{OW} och deras toxicitet för fisk samt mellan deras P_{OW} och förmåga att bindas till fasta material som jord och sediment. För en utförlig översikt över dessa samband, se hänvisning (6).

5. Det har fastställts en rad samband mellan fördelningskoefficienten 1-oktanol/vatten och andra ämnesegenskaper som är av betydelse inom miljötoxikologi och miljökemi. Fördelningskoefficienten 1-oktanol/vatten har därför kommit att bli en mycket viktig parameter vid bedömning av miljörisker med kemikalier och för att förutsäga hur de kommer att uppföra sig i miljön.

Tillämpningsområde

6. Metoden med långsam omrörning är tänkt att minska bildningen av mikrodroppar av 1-oktanol i vattenfasen. Detta torde minska risken för att koncentrationen i vattnet överskattas på grund av att molekyler av testämnet binds till sådana droppar. Metoden lämpar sig därför särskilt väl för bestämning av P_{OW} för ämnen som antas ha log P_{OW}-värden på 5 och högre, för vilka skakkolvmetoden (2) lätt kan ge felaktiga resultat.

▼M4

DEFINITIONER OCH ENHETER

7. Ett ämnes fördelningskoefficient mellan vatten och ett lipofilt lösningsmedel (1-oktanol) beskriver dess jämviktsfördelning mellan de båda faserna. Fördelningskoefficienten 1-oktanol (P_{OW}) definieras som förhållandet mellan testämnets jämviktskoncentrationer i 1-oktanol mättad med vatten (C_O) och i vatten mättat med 1-oktanol (C_W).

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

Fördelningskoefficienten är en dimensionslös storhet eftersom den beskriver förhållandet mellan två koncentrationer. Den uttrycks vanligen som tiologaritmen (log P_{OW}). P_{OW} är temperaturberoende, och rapporterade data måste därför omfatta en angivelse av temperaturen vid mätningen.

PRINCIP FÖR METODEN

8. Vid bestämning av fördelningskoefficienten bringas vatten, 1-oktanol och testämnet i jämvikt med varandra vid konstant temperatur. Därefter bestäms testämnets koncentration i de båda faserna.

9. Man kan minska problemet med bildning av mikroskopiska droppar under skakkolvförsöket genom att använda metoden med långsam omrörning som beskrivs här. Metoden går ut på att vatten, 1-oktanol och testämnet bringas i jämvikt i ett termostatreglerat reaktionskärl under omrörning. Utbytet mellan faserna påskyndas genom omrörning. Omrörningen gör också att det uppkommer viss turbulens som ökar utbytet mellan 1-oktanol och vatten utan att mikroskopiska droppar bildas (1).

TILLÄMPBARHET FÖR TESTMETODEN

10. Eftersom förekomsten av andra ämnen än testämnet kan påverka testämnets aktivitetskoefficient, bör testämnet testas som ett rent ämne. Den högsta renhet som är kommersiellt tillgänglig ska användas för fördelningsförsöket med 1-oktanol/vatten.

11. Den aktuella metoden gäller rena ämnen som inte upplöses eller förenas, och som inte visar någon signifikant gränsskiktsaktivitet. Den kan tillämpas för att bestämma fördelningsförhållandet för 1-oktanol/vatten för sådana ämnen och blandningar. När metoden används för blandningar, är fördelningsförhållandena som fastställs för 1-oktanol/vatten villkorade och beroende av den testade blandningens kemiska sammansättning och på elektrolytens sammansättning som används som vattenfas. Vidtas ytterligare åtgärder är metoden också tillämplig för dissocierings- eller associeringsföreningar (punkt 12).

12. På grund av att multipel jämvikt i vatten och 1-oktanol inblandad i fördelningen 1-oktanol/vatten av dissocierade ämnen såsom organiska syror och fenoler, organiska baser och metallorganiska ämnen, är fördelningsförhållandet 1-oktanol/vatten en villkorad konstant starkt beroende av elektrolytsammansättning (7) (8). Bestämningen av fördelningsförhållandet för 1-oktanol/vatten kräver därför att pH och elektrolytsammansättning kontrolleras i försöket och rapporteras. En sakkunnig bedömning måste användas vid utvärderingen av dessa fördelningsförhållanden. När värdet för dissociationskonstant(er) används måste lämpliga pH-värden väljas så att ett fördelningsförhållande fastställs för varje joniseringstillstånd. Icke-komplexbildande buffertar måste användas vid testning av metallorganiska föreningar (8). Med beaktande av befintlig kunskap om vattenkemi (komplexbildningskonstanter, dissociationskonstanter) bör testbetingelserna väljas på ett sådant sätt att specificeringen av testämnet i vattenfasen kan beräknas. Jonstyrkan bör vara identisk i alla försök genom användning av en bakgrundselektrolyt.

▼M4

13. Under testet kan svårigheter uppstå för ämnen med låg vattenlöslighet eller högt $P_{OW,}$ på grund av att halterna i vattnet blir så låga att det blir svårt att göra en noggrann bestämning. Den här testmetoden ger vägledning i hur man hanterar detta problem.

INFORMATION OM TESTÄMNET

14. Kemiska reagenser bör vara av analytisk renhetsgrad eller renare. För detta test rekommenderas omärkta testämnen med känd kemisk sammansättning och en renhet som helst uppgår till minst 99 %, eller radioaktivt märkta ämnen med känd kemisk sammansättning och radiokemisk renhet. När ämnen med kort halveringstid används för märkningen är det nödvändigt att korrigera för sönderfallet. För radioaktivt märkta testämnen bör man använda en analysmetod som är specifik för kemikalien i fråga, så att man kan vara säker på att den uppmätta radioaktiviteten härrör direkt från testämnet.

15. Värdet på log P_{OW} kan uppskattas med hjälp av kommersiellt tillgänglig programvara eller genom att man jämför testämnets löslighet i de båda lösningsmedlen.

16. Innan P_{OW} bestäms med den här metoden bör man ha tillgång till följande information om testämnet:

a) Strukturformel.

b) Analysmetoder som lämpar sig för att bestämma ämnets koncentration i vatten och 1-oktanol.

c) Dissociationskonstant(er) för joniserbara ämnen (OECD:s riktlinje 112 (9)).

d) Vattenlöslighet (10).

e) Abiotisk hydrolys) (11).

f) Biologisk nedbrytbarhet (12).

g) Ångtryck (13).

METODBESKRIVNING

Utrustning

17. Vanlig laboratorieutrustning behövs, i synnerhet följande:

— Magnetomrörare och teflonbelagda magnetstavar används för omrörning i vattenfasen.

— Analysinstrument som lämpar sig för att bestämma testämnets koncentration i det förväntade koncentrationsintervallet.

— Omrörningskärl med en kran i botten. Beroende på testämnets uppskattade log P_{OW}-värde och den använda analysmetodens detektionsgräns (LOD) kan det vara nödvändigt att använda ett kärl med samma geometri som är större än en liter, så att vattenvolymen är tillräckligt stor för att möjliggöra kemisk extraktion och analys. På så sätt erhålls högre koncentrationer i vattenextraktet och därmed en mer tillförlitlig analytisk bestämning. I tillägg 1 finns en tabell med uppskattade minsta volymer, detektionsgränsen för testämnet, dess uppskattade log P_{OW} och dess vattenlöslighet. Tabellen baseras på förhållandet mellan log P_{OW} och kvoten mellan ämnets löslighet i oktanol och vatten, såsom beskrivits av Pinsuwan m.fl. (14):

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

▼M4

där

$SR = S_{okt}/S_w$ (i molaritet)

samt på det förhållande för att uppskatta vattenlöslighet som beskrivits av Lyman (15). Vattenlösligheten enligt den formel som anges i tillägg 1 ska ses som en första uppskattning. Observera att det står användaren fritt att uppskatta vattenlösligheten genom samband som bättre anses representera förhållandet mellan hydrofobicitet och löslighet. För fasta föreningar rekommenderas exempelvis att man vid uppskattning av lösligheten tar hänsyn till smältpunkten. När en modifierad ekvation används bör man förvissa sig om att ekvationen för beräkning av lösligheten i oktanol fortfarande är giltig. En schematisk ritning av ett glasmantlat omrörningskärl med en volym på ca en liter finns i tillägg 2. Proportionerna på kärlet som visas i tillägg 2 har visat sig vara gynnsamma och bör bibehållas när utrustning av annan storlek används.

— Under försöket med långsam omrörning är det nödvändigt att hålla temperaturen konstant.

18. Kärlet bör vara tillverkat av ett inert material så att adsorptionen på kärlets väggar och botten är försumbar.

Beredning av testlösningar

19. Bestämningen av P_{OW} bör göras med den renaste 1-oktanol som finns i handeln (minst + 99 %). Det rekommenderas att 1-oktanol renas genom extraktion med syra, bas och vatten samt efterföljande torkning. 1-oktanol kan också renas genom destillation. Renad 1-oktanol används för att bereda standardlösningar av testämnena. Det vatten som används för bestämningen av P_{OW} ska vara destillerat i utrustning av glas eller kvarts, eller ska komma från ett reningssystem. Vatten av HPLC-kvalitet kan också användas. Destillerat vatten måste filtreras genom ett 0,22 μm filter, och för att kontrollera att de koncentrerade extrakten inte innehåller några föroreningar som kan reagera med testämnet måste blankprover ingå. Om ett glasfiberfilter används ska det rengöras genom upphettning vid 400 °C i minst tre timmar.

20. Innan försöket inleds mättas de båda lösningsmedlen med varandra genom att bringas i jämvikt i ett tillräckligt stort kärl. Detta åstadkoms genom långsam omrörning av tvåfassystemet i två dagar.

21. En lämplig koncentration av testämnet väljs och löses i 1-oktanol (mättad med vatten). Fördelningskoefficienten 1-oktanol/vatten ska bestämmas i utspädda lösningar i 1-oktanol och vatten. Testämnets koncentration bör därför inte överstiga 70 % av dess löslighet med en högsta koncentration på 0,1 M i endera fasen (1). De lösningar i 1-oktanol som används för försöket får inte innehålla något uppslammat testämne i fast form.

22. En lämplig mängd av testämnet löses i 1-oktanol (mättad med vatten). Om den uppskattade log P_{OW} är större än fem måste man se till att de lösningar i 1-oktanol som används för försöket inte innehåller något uppslammat testämne i fast form. För att undvika detta ska följande metod användas för kemikalier vars uppskattade log P_{OW}-värde är > 5:

— Lös testämnet i 1-oktanol (mättad med vatten).

▼M4

— Vänta tills det uppslammade fasta ämnet har sjunkit till botten. Kontrollera testämnets koncentration under väntetiden.

— Vänta tills testämnets koncentration i 1-oktanol har stabiliserats och späd därefter stamlösningen med en lämplig volym 1-oktanol.

— Mät den utspädda stamlösningens koncentration. Om den uppmätta koncentrationen stämmer med utspädningen kan stamlösningen användas för försöket.

Extraktion och analys av prover

23. En validerad analysmetod ska användas för bestämning av testämnet. De som utför försöket måste kunna styrka att koncentrationerna både i den vattenmättade 1-oktanolen och i den 1-oktanol-mättade vattenfasen ligger över den använda analysmetodens kvantifieringsgräns. Om det är nödvändigt att extrahera testämnet från vattenfasen och 1-oktanolfasen måste utbytet vid extraktion från respektive fas fastställas innan försöket inleds. Signalen måste korrigeras för blankvärden och det är viktigt att se till att ingen analyt överförs från ett prov till ett annat.

24. För hydrofoba testämnen som har relativt låga koncentrationer i vattenfasen är det troligen nödvändigt att extrahera vattenfasen med ett organiskt lösningsmedel och att koncentrera extraktet före analys. Av samma anledning är det också nödvändigt att blankproverna har en mycket låg koncentration. Därför måste mycket rena lösningsmedel användas, helst lösningsmedel för spårämnesanalys. Risken för att föroreningar överförs mellan proverna kan också minskas genom att man använder noggrant rengjord glasutrustning (den kan t.ex. sköljas i lösningsmedel eller upphettas vid hög temperatur).

25. Värdet på log P_{OW} kan uppskattas med hjälp av ett uppskattningsprogram eller genom sakkunnig bedömning. Om det är högre än 6 är det viktigt att korrigera för blankvärdena och kontrollera att det inte sker någon överföring av analyt mellan proverna. Om det uppskattade log P_{OW}-värdet överskrider 6 måste man använda en surrogatstandard för att korrigera för utbytet så att provet kan koncentras så mycket som möjligt före analys. Ett antal program för uppskattningen av log P_{OW} finns kommersiellt tillgängliga ([1]), t.ex. Clog P (16), KOWWIN (17), ProLogP (18) och ACD log P (19). I hänvisningarna (20–22) beskrivs olika metoder för att uppskatta log P_{OW}.

26. Kvantifieringsgränserna för bestämning av testämnet i 1-oktanol och vatten ska fastställas med vedertagna metoder. Som en tumregel kan kvantifieringsgränsen anses vara den koncentration i vatten eller 1-oktanol som ger ett signal-brusförhållande på tio. En lämplig extraktions- och förkoncentrationsmetod ska väljas, och utbytet vid analysen ska också anges. En lämplig grad av förkoncentrering väljs så att en signal av erforderlig storlek erhålls vid den analytiska bestämningen.

([1]) Denna information ges endast som information till användarna. Andra motsvarande datorprogram kan användas om man kan visa att de ger samma resultat.

▼M4

27. På grundval av analysmetodens parametrar och de förväntade koncentrationerna bestäms den ungefärliga provstorlek som krävs för en korrekt bestämning av ämnets koncentration. Man bör undvika att använda vattenprover som är så små att man inte erhåller en tillräcklig signal. Man bör likaså undvika alltför stora vattenprover, eftersom det annars kan hända att det inte finns tillräckligt mycket vatten kvar för att göra det erforderliga antalet analyser (n = 5). I tillägg 1 anges den minsta provvolymen som en funktion av kärlets volym, testämnets detektionsgräns och dess löslighet.

28. Testämnena kvantifieras genom jämförelser av kalibreringskurvorna för respektive ämne. De analyserade provernas koncentrationer måste ligga i samma intervall som standardlösningarnas koncentrationer.

29. För testämnen vars uppskattade log P_{OW} är högre än 6 måste vattenprovet spikas med en surrogatstandard före extraktionen, så att förlusterna vid extraktion och förkoncentrering av vattenproverna kan bedömas. För att utbytet ska kunna korrigeras så exakt som möjligt måste surrogatstandardens egenskaper vara mycket lika eller identiska med testämnets egenskaper. Helst ska (stabila) isotopmärkta analoger av testämnet (t.ex. deuterium- eller ^{13}C-märkta) användas. Om det inte är möjligt att använda stabila isotopmärkta analoger såsom ^{13}C eller ^{2}H ska det genom tillförlitliga litteraturuppgifter visas att surrogatstandardens fysikalisk-kemiska egenskaper ligger mycket nära testämnets. Vid vätske-vätskeextraktionen av vattenfasen kan emulsioner bildas. Detta problem kan minskas genom tillsats av salt och genom att man låter emulsionen klarna över natten. I rapporten ska det anges vilka metoder som används för extraktion och förkoncentrering av proverna.

30. Prover som tas från 1-oktanolfasen kan vid behov spädas med ett lämpligt lösningsmedel före analys. Dessutom rekommenderas att utbytet korrigeras genom användning av surrogatstandarder om det vid försök visat sig att utbytet varierar mycket (relativ standardavvikelse > 10 %).

31. Rapporten ska omfatta detaljerade uppgifter om den använda analysmetoden. Hit hör extraktions- och förkoncentrationsmetoder, utspädningsfaktorer, instrumentparametrar, kalibreringsrutin, kalibreringsområde, analytisk utbyte av testämnet från vatten, tillsats av surrogatstandarder för korrigering av utbytet, blankvärden, detektionsgränser och kvantifieringsgränser.

Testförfarande

Optimala volymförhållanden för 1-oktanol och vatten

32. När man väljer volymerna av 1-oktanol och vatten bör man beakta kvantifieringsgränserna i 1-oktanol och vatten, graden av förkoncentration av vattenproverna, provtagningsvolymerna i 1-oktanol och vatten och de förväntade koncentrationerna. Av experimentella skäl bör volymen av 1-oktanol väljas så att skiktet av 1-oktanol blir så tjockt (> 0,5 cm) att det är möjligt att ta prover från 1-oktanolfasen utan att den störs.

33. Vid bestämning av fördelningskoefficienten för ämnen med log P_{OW} på 4,5 och högre används typiskt 20 till 50 ml 1-oktanol och 950 till 980 ml vatten i ett enliterskärl.

▼M4

Testbetingelser

34. Reaktionskärlet ska vara termostatreglerat så att temperaturvariationen under försöket är mindre än 1 °C. Försöket ska utföras vid 25 °C.

35. Försökssystemet måste skyddas från dagsljus, antingen genom att försöket utförs i ett mörkt rum eller genom att reaktionskärlet täcks med aluminiumfolie.

36. Försöket ska utföras i en så dammfri miljö som möjligt.

37. Blandningen av 1-oktanol och vatten rörs om tills jämvikt inställer sig. Hur lång tid det tar att uppnå jämvikt bestäms i ett pilotförsök där prover på vatten och 1-oktanol tas med jämna mellanrum. Det ska gå minst fem timmar mellan provtagningstillfällena.

38. Varje bestämning av P_{OW} ska bygga på minst tre oberoende omrörningsförsök.

Bestämning av jämviktstiden

39. Jämvikt antas ha inställt sig när man vid regression av koncentrationsförhållandet mellan 1-oktanol och vatten som en funktion av tiden, över en tidsrymd som omfattar fyra punkter, får en lutning som inte avviker nämnvärt från 0 vid en p-nivå på 0,05. Systemet måste bringas i jämvikt under minst en dag innan provtagningen inleds. Som en tumregel kan provtagning av ämnen med ett uppskattat log P_{OW} mindre än 5 göras under dag två och tre. För mer hydrofoba ämnen kan det ta längre tid att uppnå jämvikt. För ett ämne med ett log P_{OW} på 8,23 (dekaklorbifenyl) krävdes 144 timmar för att nå jämvikt. För att avgöra om jämvikt inställt sig tas upprepade prover från ett och samma kärl.

Försökets inledning

40. Försöket inleds genom att reaktionskärlet fylls med vatten mättat med 1-oktanol. Kärlet får sedan stå tills den temperatur som termostaten är inställd på nås.

41. Därefter tillsätts försiktigt önskad mängd av testämnet (löst i erforderlig volym 1-oktanol mättad med vatten) till reaktionskärlet. Detta är ett kritiskt steg i försöket, eftersom man måste undvika turbulent blandning av de båda faserna. 1-oktanolfasen kan därför långsamt pipetteras mot reaktionskärlets vägg, nära vattenfasen. Den kommer att rinna längs glasväggen och bilda en film ovanpå vattenfasen. 1-oktanol får aldrig hällas direkt i reaktionskärlet och det är viktigt att se till att droppar av 1-oktanol inte faller direkt i vattnet.

42. Omröraren startas och omrörningshastigheten ökas långsamt. Om omrörarmotorn inte kan justeras ordentligt bör man överväga att använda en transformator. Omrörningshastigheten justeras så att strömvirveln i kontaktytan mellan vattnet och 1-oktanolen är 0,5 till högst 2,5 cm djup. Om strömvirveln är djupare än 2,5 cm ska omrörningshastigheten minskas. I annat fall kan det bildas mikrodroppar av 1-oktanol i vattenfasen, som leder till att testämnets koncentration i vattenfasen överskattas. Rekommendationen att omrörningshastigheten ska ge en virvel på högst 2,5 cm grundas på resultaten av den utförda interkalibreringen (5). Det är en kompromiss mellan önskan att snabbt uppnå jämvikt och att begränsa bildningen av mikroskopiska droppar av 1-oktanol.

▼M4

Provtagning och provberedning

43. Omröraren stängs av före provtagningen och man väntar sedan tills vätskorna slutat röra sig. När provtagningen är avslutad startas omröraren igen, först långsamt och sedan gradvis snabbare såsom beskrivs ovan.

44. Prover på vattenfasen tas från en kran i botten av reaktionskärlet. Släng alltid bort den dödvolym vatten som finns i kranen (ca 5 ml i det kärl som visas i tillägg 2). Vattnet i kranen är inte omrört och är därför inte i jämvikt med resten av vätskan i kärlet. Anteckna vattenprovernas volym och se till att testämnet som finns i det slängda vattnet beaktas när massbalansen upprättas. Avdunstningsförlusterna minimeras genom att vattnet sakta får rinna in i separertratten, utan att vatten- och 1-oktanolfaserna störs.

45. Prover av 1-oktanol tas genom att små alikvoter (ca 100 µl) avlägsnas från 1-oktanolfasen med en 100 mikrolitersspruta helt av glas och metall. Det är viktigt att de båda vätskorna inte blandas i kontaktytan. Den provtagna vätskans volym antecknas. Det räcker med små alikvoter eftersom 1-oktanol-provet späds ut.

46. Onödiga provöverföringssteg bör undvikas. Provvolymen bör därför bestämmas gravimetriskt. För vattenprover kan detta åstadkommas genom att man samlar upp vattenprovet i en separertratt som redan innehåller den erforderliga mängden lösningsmedel.

DATA OCH RAPPORTERING

47. Enligt den här metoden bestäms P_{OW} genom att man utför tre omrörningsförsök med det ämne som ska undersökas under identiska betingelser. Den regressionsanalys som används för visa att jämvikt uppnåtts ska grundas på resultaten av minst fyra på varandra bestämningar av C_O/C_W vid olika tidpunkter. På så sätt kan man beräkna variansen som ett mått på osäkerheten för det medelvärde som erhålls från varje försöksenhet.

48. P_{OW} kan beskrivas genom den varians i data som erhålls i varje försöksenhet. Denna information används för att beräkna P_{OW} som det vägda medelvärdet för resultaten i de enskilda försöksenheterna. Det inverterade värdet på variansen hos resultaten från försöksenheterna används som vikt. Detta leder till att data som uppvisar en stor variation (uttryckt som varians) och som därför är mindre tillförlitliga inte påverkar resultaten lika mycket som data med liten varians.

49. Den vägda standardavvikelsen beräknas på samma sätt. Den beskriver P_{OW}-mätningens repeterbarhet. Ett lågt värde på den vägda standardavvikelsen visar att bestämningen av P_{OW} har en mycket god repeterbarhet inom ett och samma laboratorium. Den formella statistiska behandlingen av erhållna data beskrivs nedan.

▼M4

Behandling av resultaten

Demonstration av att jämvikt uppnåtts

50. Logaritmen för förhållandet mellan testämnets koncentrationer i 1-oktanol och vatten (log (C_O/C_w)) beräknas för varje provtagningstidpunkt. För att visa att jämvikt uppnåtts plottas detta förhållande som en funktion av tiden. En platå i kurvan, som ska omfatta minst fyra på varandra följande mätpunkter, tyder på att jämvikt har uppnåtts och att ämnet verkligen är löst i 1-oktanol. Om så inte är fallet måste försöket fortgå tills fyra på varandra följande mätpunkter ger en lutning som inte avviker nämnvärt från 0 vid en p-nivå på 0,05, vilket anger att log C_o/C_w är oberoende av tid.

Beräkning av log P_{OW}

51. Värdet på log P_{OW} i försöksenheten beräknas som det vägda medelvärdet för log C_o/C_w för den del av kurvan (log C_o/C_w som en funktion av tiden) där det har visats att jämvikt uppnåtts. Det vägda medelvärdet beräknas genom att data vägs med det inverterade värdet på variansen så att deras påverkan på slutresultatet är omvänt proportionell mot deras osäkerhet.

Genomsnittligt log P_{OW}

52. Medelvärdet av log P_{OW} för olika försöksenheter beräknas som medelvärdet av resultaten från de enskilda försöken viktade med sina respektive varianser.

Beräkningen utförs med hjälp av följande formel:

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

där

$\log P_{OW,i}$ = log P_{OW}-värdet för den enskilda försöksenheten i

$\log P_{OW,Av}$ = det vägda medelvärdet för de enskilda bestämningarna av log P_{OW}

w_i = den statistiska vikt som tilldelats log P_{OW}-värdet för försöksenhet i.

Den inverterade variansen för log $P_{OW,i}$ används som w_i ($w_i = \text{var}(\log P_{OW,i})^{-1}$).

53. Medelfelet av log P_{OW} uppskattas som den repeterbarhet för log C_o/C_w som bestäms under jämviktsfasen i varje enskild försöksenhet. Det uttrycks som den vägda standardavvikelsen för log $P_{OW,Av}$ ($\sigma_{\log\ Pow,Av}$) som i sin tur är ett mått på det fel som hänger samman med $P_{OW,Av}$. Den vägda standardavvikelsen kan beräknas från den viktade variansen ($var_{\log\ Pow,Av}$) enligt följande formel:

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

$$\sigma_{\log Pow,Av} = (var_{\log Pow,Av})^{0,5}$$

Symbolen n står för antalet försöksenheter.

▼M4

Testrapport

54. Testrapporten ska omfatta följande information:

Testämne:

— Trivialnamn, kemiskt namn, CAS-nummer, strukturformel (med angivande av den radioaktiva isotopens position för märkta ämnen) och relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper (se punkt 17).

— Testämnets renhet (föroreningar).

— Renhet och aktivitet per mol hos den isotop som använts för märkning (i förekommande fall).

— Preliminär uppskattning av log P_{ow} samt angivande av den metod som används för att komma fram till detta värde.

Försöksbetingelser:

— Datum för utförandet av studierna.

— Temperatur under försöket.

— Volymer av 1-oktanol och vatten i början av testet.

— Borttagna provvolymer av 1-oktanol och vatten.

— Volymer 1-oktanol och vatten som återstår i testkärlen.

— Beskrivning av reaktionskärl och omrörningsparametrar (omrörarmagnetens och reaktionskärlets form, strömvirvelns djup i mm samt omrörningshastigheten om denna är känd).

— Metoder som använts för att analysera testämnet och dess kvantifieringsgräns.

— Provtagningstider.

— Vattenfasens pH-värde och eventuella buffertar som använts för att justera pH-värdet hos joniserbara molekyler.

— Antal replikat.

Resultat:

— De använda analysmetodernas repeterbarhet och känslighet.

— Koncentrationer av testämnet i 1-oktanol och vatten som funktion av tid.

— Demonstration av massbalans.

— Temperatur och standardavvikelse eller temperaturintervallet under försöket.

— En kurva som visar förhållandet mellan koncentrationer som funktion av tid.

— Medelvärdet för log $P_{ow,Av}$ och dess standardfel.

— Diskussion och tolkning av resultaten.

▼M4

— Exempel på rådata från en representativ analys (i enlighet med god laboratoriesed ska alla rådata sparas) som omfattar uppgifter om utbyten för surrogatstandarder, antal punkter på kalibreringskurvan (med angivande av kriterier för kalibreringskurvans korrelationskoefficient) samt resultat av kvalitetssäkring och kvalitetskontroll (QA/QC).

— Samt när det finns tillgängligt: Valideringsrapport för analysmetoden (ska tas upp i litteraturhänvisningarna).

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 denna bilaga, fördelningskoefficient.

(3) Kapitel A.8 i denna bilaga, fördelningskoefficient.

(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, Förenta staterna.

(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 denna bilaga, vattenlöslighet.

(11) Kapitel C.7 i denna bilaga, nedbrytning – abiotisk nedbrytning: hydrolys som funktion av pH.

(12) Kapitel C.4 – del II–VII (Metod A till F) i denna bilaga, bestämning av ”lätt” bionedbrytbarhet.

(13) Kapitel A.4 i denna bilaga, ångtryck.

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

(15) Lyman WJ (1990). Solubility in water. I: 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 to 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, Kanada, 2001.

▼**M4**

(20) Lyman WJ (1990). Octanol/water partition coefficient. I 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

Tillägg 1

Kalkylblad för beräkning av de minsta vattenvolymer som krävs för detektion av testämnen med olika log P_{OW}-värden i vattenfasen

Antaganden:

— Maximal volym av enskilda alikvoter = 10 % av den totala volymen; 5 alikvoter = 50 % av den totala volymen.

— Testämnens koncentration = 0,7 × löslighet i endera fasen. Vid lägre koncentrationer krävs större volymer.

— Volym som används för bestämning av detektionsgräns = 100 ml.

— log P_{ow} som en funktion av log S_w och log P_{ow} som en funktion av SR (S_{okt}/S_w) åskådliggör testämnenas förhållanden på ett rimligt sätt.

Uppskattning av S_w

log P_{ow}	Formel	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

Uppskattning av S_{oct}

log P_{ow}	Formel	S_{okt} (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**

Testämnets totala massa (mg)	$Massa_{oct}$/ $Massa_{vatten}$	$Massa_{H2O}$ (mg)	$Konc_{H2O}$ (mg/l)	$Massa_{oct}$ (mg)	$Konc_{okt}$ (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

Beräkning av volymer

Minsta volym som krävs för H_2O-fasen vid olika detektionsgränser (uttryckta som koncentration)

log K_{ow}	Detektionsgräns (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
Använd volym vid detektionsgränsen (I)	0,1					

Beräkningsnyckel

Utgör < 10 % av vattenfasens totala volym, 1 liters jämviktskärl.

Utgör < 10 % av vattenfasens totala volym, 2 liters jämviktskärl.

Utgör < 10 % av vattenfasens totala volym, 5 liters jämviktskärl.

Utgör < 10 % av vattenfasens totala volym, 10 liters jämviktskärl.

Överskrider 10 % även av ett 10 liters jämviktskärl.

▼M4

Översikt över erforderliga volymer som en funktion av vattenlösligheten och log P_{ow}

Minsta volym som krävs för H_2O-fasen vid olika detektionsgränser (ml)

log P_{ow}	S_w (mg/l)	Detektionsgräns (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

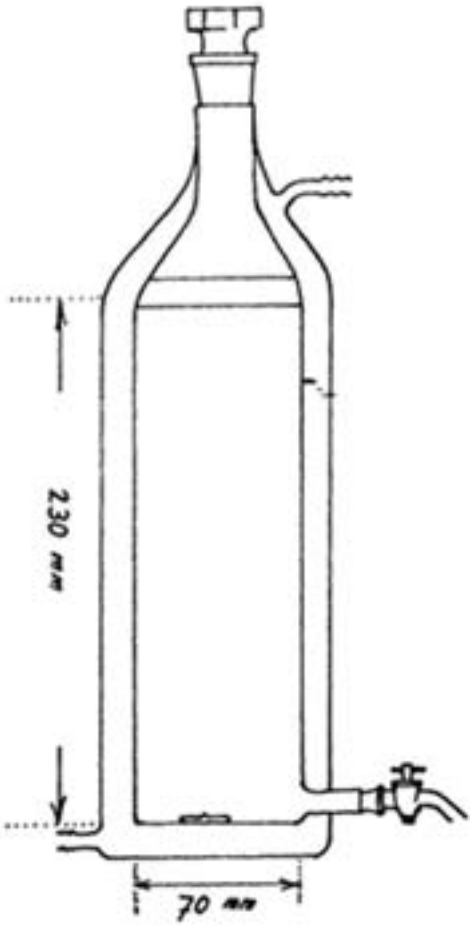
▼**M4**

log P_{ow}	S_w (mg/l)	Detektionsgräns (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
Använd volym vid detektionsgränsen (l)		0,1					

▼M4

Tillägg 2

Exempel på glasmantlat reaktionskärl för det försök med långsam omrörning som används för att bestämma P_{OW}



▼M6

A.24 FÖRDELNINGSKOEFFICIENT (N-OKTANOL/VATTEN), VÄTSKEKROMATOGRAFIMETODEN (HPLC)

INLEDNING

Denna testmetod motsvarar OECD:s testriktlinje (TG) 117 (2004).

1. Fördelningskoefficienten (P) definieras som förhållandet mellan jämviktskoncentrationerna för ett ämne som lösts i ett tvåfassystem bestående av två i stort sett icke blandbara lösningsmedel. När det gäller n-oktanol och vatten är

$$P_{ow} = \frac{C_n - \text{oktanol}}{C_{\text{vatten}}}$$

Eftersom fördelningskoefficienten är kvoten av två koncentrationer är den dimensionslös. Den uttrycks vanligen i form av en 10-logaritm.

2. P_{ow} är en viktig parameter i studier av kemiska ämnens omvandling, spridning och fördelning i miljön. Ett högsignifikant förhållande mellan P_{ow} för icke-joniserade ämnen och deras bioackumulering i fisk har påvisats. Det har också visats att P_{ow} är en användbar parameter vid uppskattning av adsorption till jord och sediment och för fastställande av kvantitativa struktur-aktivitetssamband för ett stort antal biologiska effekter.

3. Det ursprungliga förslaget till denna testmetod grundades på en artikel av C. V. Eadsforth och P. Moser (1). Utvecklingen av testmetoden och OECD:s jämförelse mellan laboratorier samordnades av den federala tyska miljöskyddsmyndigheten (Umweltbundesamt) under 1986

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN

4. Värden för log P_{ow} i området – 2 till 4 (ibland upp till 5 eller däröver) ([1]) kan bestämmas experimentellt genom skakkolvmetoden (kapitel A.8 i denna bilaga, OECD:s testriktlinje 107). HPLC-metoden omfattar log P_{ow} i intervallet 0 till 6 (1) (2) (3) (4) (5). Denna metod kan kräva en uppskattning av P_{ow} för att välja ut lämpliga referensämnen och underbygga de slutsatser som dras utifrån erhållna testdata. Beräkningsmetoderna diskuteras kortfattat i tillägget till denna testmetod. HPLC-driftläget är isokratiskt.

5. Värdena för P_{ow} beror på miljöfaktorer såsom temperatur, pH, jonstyrka osv., och dessa bör definieras i experimentet för en korrekt tolkning av P_{ow}-data. För joniserbara ämnen kan en annan metod (t.ex. utkast till OECD-riktlinjer för den pH-metriska metoden för joniserade ämnen (6)) komma att bli tillgänglig och skulle kunna användas som alternativ metod. Även om detta utkast till OECD-riktlinjer kan vara lämpligt för att bestämma P_{ow} för sådana joniserbara ämnen är det i vissa fall lämpligare att använda HPLC-metoden vid ett miljömässigt relevant pH-värde (se punkt 9).

([1]) Den övre gränsen sätts med tanke på behovet att åstadkomma en fullständig separationsfas efter att fördelningsjämvikten justerats och innan man tar prover för analytisk bestämning. Om lämpliga försiktighetsåtgärder vidtas kan den övre gränsen höjas till högre värden för P_{ow}.

▼M6

PRINCIP FÖR TESTMETODEN

6. Omvänd-fas-kromatografi utförs på analyskolonner som är packade med en kommersiellt tillgänglig fast fas innehållande långa kolvätekedjor (t.ex. C8, C18), vilka är kemiskt bundna till kiseldioxid.

7. En kemikalie som injiceras i en sådan kolonn kommer att fördelas mellan den mobila lösningsmedelsfasen och den stationära kolvätefasen när den transporteras genom kolonnen av den mobila fasen. Ämnena hålls kvar i proportion till sin fördelningskoefficient kolväte/vatten. Hydrofila ämnen elueras ut först och lipofila ämnen sist. Retentionstiden beskrivs av kapacitetsfaktorn k, som ges av formeln

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

där t_R är testämnets retentionstid och t_0 är dödtiden, dvs. den genomsnittliga tid det tar för en lösningsmedelsmolekyl att passera genom kolonnen. Det krävs inga kvantitativa analysmetoder, och endast bestämningen av retentionstiderna är nödvändig.

8. Fördelningskoefficienten oktanol/vatten för ett testämne kan beräknas genom att man experimentellt bestämmer dess kapacitetsfaktor k och därefter för in k i formeln

$$\log P_{ow} = a + b \times \log\ k$$

där

a, b = linjära regressionskoefficienter.

Ovanstående formel kan erhållas genom linjär regression av log av fördelningskoefficienterna oktanol/vatten för referensämnena mot log av kapacitetsfaktorerna för referensämnena.

9. Metoden med omvänd-fas-kromatografi gör det möjligt att uppskatta fördelningskoefficienter i log P_{ow}-området mellan 0 och 6, men kan i undantagsfall utvidgas till att omfatta log P_{ow}-området mellan 6 och 10. Detta kan innebära att den mobila fasen måste modifieras (3). Metoden kan inte användas för starka syror och baser, metallkomplex, ämnen som reagerar med eluenten eller ytaktiva medel. Mätningar på joniserbara ämnen kan utföras på den icke-joniserade formen (fri syra eller fri bas) endast genom användning av en lämplig buffert med ett pH-värde under pK_a för en fri syra eller över pK_a för en fri bas. Alternativt kan den pH-metriska metoden för testning av joniserbara ämnen (6) komma att bli tillgänglig och skulle kunna användas som alternativ metod (6). Om log P_{ow}-värdet fastställs för att användas i en miljöfarlighetsklassificering eller miljöriskbedömning, bör testet utföras med ett pH-värde som är relevant för den naturliga miljön, dvs. på mellan 5,0 och 9.

10. I vissa fall kan orenheter göra det svårt att tolka resultaten, eftersom toppvärdena blir osäkra. För blandningar med ett oupplöst band anges en övre och nedre gräns för log P_{ow}, och areaprocenten för varje log P_{ow}-topp ska rapporteras. För blandningar som utgörs av en grupp homologer bör även det vägda genomsnittet för log P_{ow} anges (7), beräknat på de enskilda P_{ow}-värdena och motsvarande areaprocentvärden (8). Alla toppar som bidrar med minst 5 % av den totala topparean bör beaktas i beräkningen (9):

▼M6

$$vägt\ genomsnitt\ \log\ P_{ow} = \frac{\sum_i (\log\ P_{owi})(area\ \%)}{total\ topparea\ \%} = \frac{\sum (log\ P_{owi})(area\ \%_i)}{\sum_i area\ \%}$$

Det vägda genomsnittet för log P_{ow} gäller endast för ämnen eller blandningar (t.ex. talloljor) som består av homologer (t.ex. alkanserier). Blandningar kan mätas med meningsfulla resultat förutsatt att den analytiska detektor som används har samma känslighet för alla ämnen i blandningen och en lämplig upplösning kan erhållas.

INFORMATION OM TESTÄMNET

11. Dissociationskonstant, strukturformel och löslighet i den mobila fasen bör vara kända innan metoden används. Dessutom kan information om hydrolys vara till nytta.

KVALITETSKRITERIER

12. För att öka mätningens tillförlitlighet ska dubbla bestämningar göras.

— Repeterbarhet: Värdet på log P_{ow} från upprepade mätningar som gjorts under identiska förhållanden och med användning av samma uppsättning referensämnen ska ligga inom ± 0,1 logaritmenheter.

— Reproducerbarhet: Om mätningarna upprepas med en annan uppsättning referensämnen kan resultaten skilja sig åt. Vanligtvis är korrelationskoefficienten R för förhållandet mellan log k och log P_{ow} för en uppsättning testämnen omkring 0,9, vilket motsvarar en fördelningskoefficient oktanol/vatten på log P_{ow} ± 0,5 logaritmenheter.

13. Jämförelsen mellan laboratorier har visat att man med HPLC-metoden kan erhålla värden på log P_{ow} som ligger inom ± 0,5 enheter av värdena från skakkolvmetoden (2). Andra jämförelser återfinns i referenserna (4) (5) (10) (11) (12). Korrelationsdiagram baserade på strukturellt besläktade referensämnen ger tillförlitligast resultat (13).

REFERENSÄMNEN

14. För att kunna korrelera den uppmätta kapacitetsfaktorn k för ett ämne med dess P_{ow} måste en kalibreringskurva med minst 6 punkter upprättas (se punkt 24). Det är upp till användaren att välja lämpliga referensämnen. Referensämnena bör normalt sett ha log P_{ow}-värden som omger testämnets log P_{ow}-värde, dvs. minst ett referensämne bör ha ett P_{ow}-värde som ligger över testämnets, och minst ett bör ha ett P_{ow}-värde som ligger under testämnets. Extrapolering bör endast användas i undantagsfall. Referensämnena ska helst vara strukturellt besläktade med testämnet. Referensämnenas log P_{ow}-värden för kalibreringen bör baseras på tillförlitliga experimentella data. För ämnen med högt log P_{ow}-värde (normalt över 4) kan dock beräknade värden användas om tillförlitliga experimentella data inte finns tillgängliga. Om extrapolerade värden används bör ett gränsvärde anges.

15. Det finns omfattande listor över log P_{ow}-värden för många grupper av kemikalier (14) (15). Om data rörande fördelningskoefficienter för strukturellt besläktade ämnen inte finns att tillgå kan en mer allmän kalibrering med andra referensämnen användas. Rekommenderade referensämnen och deras P_{ow}-värden anges i tabell 1. För joniserbara ämnen gäller de angivna värdena den icke-joniserade formen. Värdena kontrollerades i fråga om trovärdighet och kvalitet i samband med jämförelsen mellan laboratorierna.

▼**M6**

Tabell 1

Rekommenderade referensämnen

	CAS-nummer	Referensämne	Log P_{ow}	pKa
1	78-93-3	2-Butanon (metyletylketon)	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	Bensylalkohol	1,1	
6	150-76-5	4-Metoxifenol	1,3	pKa = 10,26
7	122-59-8	Fenoxiättiksyra	1,4	pKa = 3,12
8	108-95-2	Fenol	1,5	pKa = 9,92
9	51-28-5	2,4-Dinitrofenol	1,5	pKa = 3,96
10	100-47-0	Bensonitril	1,6	
11	140-29-4	Bensylcyanid	1,6	
12	589-18-4	4-Metylbensenalkohol	1,6	
13	98-86-2	Acetofenon	1,7	
14	88-75-5	2-Nitrofenol	1,8	pKa = 7,17
15	121-92-6	3-Nitrobensoesyra	1,8	pKa = 3,47
16	106-47-8	4-Kloranilin	1,8	pKa = 4,15
17	98-95-3	Nitrobensen	1,9	
18	104-54-1	Kanelalkohol	1,9	
19	65-85-0	Bensoesyra	1,9	pKa = 4,19
20	106-44-5	p-Kresol	1,9	pKa = 10,17
21	140-10-3 (trans)	Kanelsyra	2,1	pKa = 3,89 (cis) 4,44 (trans)
22	100-66-3	Anisol	2,1	
23	93-58-3	Metylbensoat	2,1	
24	71-43-2	Bensen	2,1	
25	99-04-7	3-Metylbensoesyra	2,4	pKa = 4,27
26	106-48-9	4-Klorfenol	2,4	pKa = 9,1
27	79-01-6	Trikloretylen	2,4	
28	1912-24-9	Atrazin	2,6	
29	93-89-0	Etylbensoat	2,6	

▼**M6**

	CAS-nummer	Referensämne	Log P_{ow}	pKa
30	1194-65-6	2,6-Diklorbensonitril	2,6	
31	535-80-8	3-Klorbensoesyra	2,7	pKa = 3,82
32	108-88-3	Toluen	2,7	
33	90-15-3	1-Naftol	2,7	pKa = 9,34
34	608-27-5	2,3-Dikloranilin	2,8	
35	108-90-7	Klorbensen	2,8	
36	1746-13-0	Allylfenyleter	2,9	
37	108-86-1	Bromobensen	3,0	
38	100-41-4	Etylbensen	3,2	
39	119-61-9	Bensofenon	3,2	
40	92-69-3	4-Fenylfenol	3,2	pKa = 9,54
41	89-83-8	Tymol	3,3	
42	106-46-7	1,4-Diklorbensen	3,4	
43	122-39-4	Difenylamin	3,4	pKa = 0,79
44	91-20-3	Naftalen	3,6	
45	93-99-2	Fenylbensoat	3,6	
46	98-82-8	Isopropylbensen	3,7	
47	88-06-2	2,4,6-Triklorfenol	3,7	pKa = 6
48	92-52-4	Bifenyl	4,0	
49	120-51-4	Bensylbensoat	4,0	
50	88-85-7	2,4-Dinitro-6-sek-butylfenol	4,1	
51	120-82-1	1,2,4-Triklorbensen	4,2	
52	143-07-7	Laurinsyra	4,2	pKa = 5,3
53	101-84-8	Difenyleter	4,2	
54	85-01-8	Fenantren	4,5	
55	104-51-8	n-Butylbensen	4,6	
56	103-29-7	Dibensyl	4,8	
57	3558-69-8	2,6-Difenylpyridin	4,9	
58	206-44-0	Fluoranten	5,1	
59	603-34-9	Trifenylamin	5,7	
60	50-29-3	DDT	6,5	

▼M6

BESKRIVNING AV TESTMETODEN

Preliminär uppskattning av fördelningskoefficienten

16. Om det är nödvändigt att uppskatta testämnets fördelningskoefficient kan detta företrädesvis göras genom en beräkning (se tillägg) eller, i förekommande fall, genom att använda testämnets lösningsgrad i rena lösningsmedel.

Utrustning

17. För testet krävs en vätskekromatograf försedd med en pulsfri pump och lämplig detekteringsutrustning. En UV-detektor för våglängden 210 nm eller en RI-detektor kan användas för ett stort antal kemiska grupper. Närvaron av polära grupper i den stationära fasen kan avsevärt försämra HPLC-kolonnens effektivitet. De stationära faserna bör därför ha lägsta möjliga procentuella innehåll av polära grupper (16). Ett kommersiellt mikroniserat packmaterial med omvänd fas eller färdigpackade kolonner kan användas. Eventuellt kan en förkolonn placeras mellan injektionssystemet och analyskolonnen.

Mobil fas

18. Metanol av HPLC-kvalitet och destillerat eller avjonat vatten används för att framställa elueringsvätskan, som avgasas före användning. Isokratisk eluering bör användas. Den använda metanol/vattenblandningen ska innehålla minst 25 % vatten. Vanligtvis är en 3:1 (v/v) blandning av metanol/vatten lämplig för eluering av ämnen med ett log P-värde på 6 inom en timme, om flödeshastigheten är 1 ml/min. För ämnen med log P-värden över 6 kan det vara nödvändigt att minska elueringstiden (även för referensämnena) genom att använda en mindre polär mobil fas eller en kortare kolonn.

19. Testämnet och referensämnena ska vara lösliga i den mobila fasen i en tillräckligt hög koncentration för att de ska kunna påvisas. Tillsatser får endast i undantagsfall användas i metanol/vattenblandningen, eftersom de ändrar kolonnens egenskaper. I sådana fall måste man se till att retentionstiden för test- och referensämnena inte påverkas. Om en metanol/vattenblandning inte är lämplig kan andra organiska lösningsmedel/vattenblandningar användas, t.ex. etanol/vatten, acetonitril/vatten eller isopropylalkohol (2-propanol)/vatten.

20. Elueringsvätskans pH-värde är av största vikt för joniserbara ämnen. Värdet ska ligga inom kolonnens pH-värde under drift, normalt mellan 2 och 8. Det rekommenderas att man använder en buffert. Det är viktigt att undvika saltutfällning och försämring av kolonnen, vilket kan förekomma med vissa blandningar av organisk fas och buffert. HPLC-mätningar med kiseldioxidbaserade stationära faser med pH över 8 rekommenderas normalt inte, eftersom användning av en alkalisk mobil fas kan leda till att kolonnens effektivitet snabbt försämras.

Lösta ämnen

21. Test- och referensämnena ska vara tillräckligt rena för att topparna i kromatogrammen ska kunna tillskrivas respektive ämne. Ämnen avsedda att användas för testning och kalibrering löses i den rörliga fasen om så är möjligt. Om ett annat lösningsmedel än den mobila fasen används för test- och referensämnena bör den mobila fasen användas för den slutliga utspädningen före injicering.

Testbetingelser

22. Temperaturen under mätningarna bör inte variera med mer än ± 1 °C.

▼M6

Bestämning av dödtiden t_0

23. Dödtiden t_0 kan mätas med hjälp av organiska ämnen som inte hålls kvar (t.ex. tiourea eller formamid). En mer exakt dödtid kan härledas från de uppmätta retentionstiderna eller en uppsättning på ungefär sju komponenter i en homolog serie (t.ex. n-alkylmetylketoner) (17). Retentionstiderna t_R (n_C + 1) plottas mot t_R (n_C), där n_C är antalet kolatomer. En rak linje, t_R (n_C + 1) = A t_R (n_C) + (1 – A)t_0, erhålls, där A, som motsvarar k(n_C + 1)/k(n_C), är konstant. Dödtiden t_0 erhålls från skärningspunkten mellan (1 – A)t_0 och riktningskoefficienten A.

Regressionsformel

24. Nästa steg består i att plotta en korrelation log k mot log P för lämpliga referensämnen med log P-värden som ligger nära det förväntade värdet för testämnet. I praktiken injiceras mellan 6 och 10 referensämnen samtidigt. Retentionstiderna bestäms, helst med en integrationsskrivare som är kopplad till detektionssystemet. Motsvarande logaritmer för kapacitetsfaktorerna, log k, plottas som en funktion av log P. Regressionsformeln beräknas regelbundet, minst en gång om dagen, så att hänsyn kan tas till eventuella ändringar i kolonnens effektivitet.

BESTÄMNING AV P_{OW} FÖR TESTÄMNET

25. Minsta detekterbara mängd av testämnet injiceras. Dubbla bestämningar av retentionstiden görs. Fördelningskoefficienten för testämnet erhålls genom att interpolera den beräknade kapacitetsfaktorn på kalibreringskurvan. Vid mycket låga och mycket höga fördelningskoefficienter är det nödvändigt att extrapolera. Särskilt i dessa fall måste regressionslinjens konfidensgränser beaktas. Om retentionstiden för ett prov ligger utanför intervallet för de retentionstider som erhållits för referensämnena bör ett gränsvärde anges.

DATA OCH RAPPORTERING

Testrapport

26. Följande ska ingå i rapporten:

— om en bestämning gjorts ska den preliminära uppskattningen av fördelningskoefficienten, de uppskattade värdena och den metod som använts ingå, och om en beräkningsmetod använts ska en fullständig beskrivning ingå, inklusive identifiering av databasen och detaljerad information om val av fragment,

— test- och referensämnen: renhetsgrad, strukturformel och CAS-nummer,

— beskrivning av utrustningen och testbetingelserna: analyskolonn, förkolonn,

— mobil fas, detektionssystem, temperaturområde, pH,

— elueringsprofiler (kromatogram),

— dödtiden och hur den uppmätts,

— retentionsdata och publicerade referensvärden för log P_{ow} för referensämnen som använts vid kalibrering,

— närmare uppgifter om den anpassade regressionslinjen (log k mot log P_{ow}) och korrelationskoefficienten på linjen inklusive konfidensintervallen,

▼**M6**

— genomsnittliga retentionsdata och interpolerat log P_{ow}-värde för testämnet,

— för blandningar: kromatogram för elueringsprofiler med angivna gränsvärden,

— log P_{ow}-värden i förhållande till areaprocenten för log P_{ow}-toppen,

— beräkning med hjälp av en regressionslinje,

— i förekommande fall, beräknade vägda genomsnittsvärden för log P_{ow}.

LITTERATUR

(1) C. V. Eadsforth och P. Moser. (1983). Assessment of Reverse Phase Chromatographic Methods for Determining Partition Coefficients. Chemosphere. 12, 1459.

(2) W. Klein, W. Kördel, M. Weiss och 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 och 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. Utkast till riktlinje, 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), bilaga 10, Oviedo, 20–24 februari 1995.

(8) M. Thatcher, M. Robinson, L. R. Henriquez och C. C. Karman. (1999). A User Guide for the Evaluation of Chemicals Used and Discharged Offshore, A CIN Revised CHARM III Report 1999. Version 1.0, 3 augusti.

(9) E. A. Vik, S. Bakke och 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. Sundström och 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 och 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 och 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 och 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 och A. J. Leo. (1979). Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology. John Wiley, New York.

(15) C. Hansch, ordförande; A. J. Leo, direktör. (1982). Log P and Parameter Database: A tool for the quantitative prediction of bioactivity. Kan rekvireras från Pomona College Medical Chemistry Project, Pomona College, Claremont, California 91711.

(16) R. F. Rekker och 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 och J. Inczédy. (1980). On determination of hold-up time in reversed-phase liquid chromatography. J. Liq. Chromato. 3, 1669.

▼M6

Tillägg

Beräkningsmetoder för P_{OW}

INLEDNING

1. Detta tillägg ger en kort introduktion till beräkningen av P_{ow}. För ytterligare uppgifter hänvisas läsaren till läroböcker (1) (2).

2. Beräknade värden på P_{ow} används för

— att bestämma vilken försöksmetod som ska användas: skakkolvmetoden för log P_{ow}-värden mellan – 2 och 4 och HPLC-metoden för log P_{ow}-värden mellan 0 och 6,

— valet av testförhållanden för HPLC (referensämnen, förhållandet metanol/vatten),

— kontroll av rimligheten för de värden som erhålls genom experimentella metoder,

— att tillhandahålla en uppskattning för fall där experimentella metoder inte kan användas.

Princip för beräkningsmetoderna

3. De beräkningsmetoder som föreslås här bygger på teoretisk fragmentering av molekylen i lämpliga understrukturer för vilka tillförlitliga log P_{ow}-inkrementer är kända. Log P_{ow} erhålls genom att summera fragmentvärdena och korrigeringsfaktorerna för intramolekylär växelverkan. Förteckningar över fragmentkonstanter och korrigeringsfaktorer finns tillgängliga (1) (2) (3) (4) (5) (6). Vissa av dem uppdateras regelbundet (3).

Tillförlitlighet för beräknade värden

4. I allmänhet minskar beräkningsmetodernas tillförlitlighet i takt med att komplexiteten hos de undersökta ämnena ökar. För enkla molekyler med låg molekylvikt och en eller två funktionella grupper kan man förvänta sig en avvikelse på 0,1–0,3 log P_{ow}-enheter mellan resultaten av de olika fragmenteringsmetoderna och de uppmätta värdena. Felmarginalen beror på de använda fragmentkonstanternas tillförlitlighet, förmågan att känna igen intramolekylära växelverkningar (t.ex. vätebindningar) och den korrekta användningen av korrigeringsfaktorer. För joniserbara ämnen måste laddningen och graden av jonisering beaktas (10).

Fujita-Hansch π-metod

5. Konstanten för hydrofoba substituenter, π, som ursprungligen infördes av Fujita m.fl. (7), definieras som:

$$^{\pi}X = \log P_{ow}\ (PhX) - \log P_{ow}\ (PhH)$$

där PhX är ett aromatiskt derivat och PhH modersubstansen.

$$\text{T.ex.}\quad ^{\pi}Cl = \log P_{ow}\ (C_6H_5Cl) - \log P_{ow}\ (C_6H_6)$$
$$= 2{,}84 - 2{,}13$$
$$= 0{,}71$$

π-metoden är huvudsakligen av intresse för aromatiska föreningar. π-värden för ett stort antal substituenter finns tillgängliga (4) (5).

Rekkers metod

6. Med Rekkers metod (8) beräknas log P_{ow}-värdet på följande sätt:

$$LogP_{ow} = \sum_i a_i f_i + \sum_j (\text{samspelstmer})$$

▼M6

där a_i är antalet gånger ett visst fragment förekommer i molekylen och f_i är log P_{ow}-inkrementet för fragmentet. Samspelstermerna kan uttryckas som en integral multipel av en enda konstant C_m (den s.k. magiska konstanten). Fragmentkonstanterna f_i och C_m har fastställts på grundval av en tabell med 1 054 experimentellt bestämda P_{ow}-värden för 825 ämnen med hjälp av flerdimensionell regressionsanalys (6) (8). Fastställandet av samspelstermerna utförs i enlighet med fastställda regler (6) (8) (9).

Hansch-Leos metod

7. Med Hansch-Leos metod (4) beräknas log P_{ow}-värdet på följande sätt:

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

där f_i är en fragmentkonstant, F_j en korrigeringsfaktor, och a_i och b_j är motsvarande förekomstfrekvenser. Förteckningarna över atom- och gruppfragmentvärden och korrigeringsfaktorerna F_j har tagits fram genom trial-and-error på grundval av experimentellt bestämda värden på P_{ow}. Korrigeringsfaktorerna har delats in i flera olika klasser (1) (4). Programpaket har utvecklats som tar hänsyn till alla regler och korrigeringsfaktorer (3).

KOMBINERAD METOD

8. Beräkningen av log P_{ow} för komplexa molekyler kan förbättras betydligt om molekylen delas upp i större delstrukturer för vilka tillförlitliga log P_{ow}-värden finns tillgängliga, antingen i tabeller (3) (4) eller från utförda mätningar. Sådana fragment (t.ex. heterocykler, antrakinon, azobensen) kan sedan kombineras med Hanschs π-värden eller med Rekkers eller Leos fragmentkonstanter.

Anmärkningar

i) Beräkningsmetoderna är endast tillämpliga på helt eller delvis joniserade ämnen om de nödvändiga korrigeringsfaktorerna beaktas.

ii) Om intramolekylära vätebindningar kan antas förekomma måste motsvarande korrigeringsfaktorer (cirka + 0,6 till + 1,0 log P_{ow}-enheter) läggas till (1). Indikationer på närvaron av sådana bindningar kan erhållas från stereomodeller eller spektroskopiska data.

iii) Om flera tautomeriska former är möjliga ska den mest sannolika formen användas som grund för beräkningen.

iv) Revisioner av listor med fragmentkonstanter bör följas noggrant.

LITTERATUR OM BERÄKNINGSMETODER

(1) W. J. Lyman, W. F. Reehl och D.H. Rosenblatt (red.). Handbook of Chemical Property Estimation Methods, McGraw-Hill, New York (1982).

(2) W. J. Dunn, J. H. Block och R. S. Pearlman (red.). Partition Coefficient, Determination and Estimation, Pergamon Press, Elmsford (New York) och Oxford (1986).

(3) Pomona College, Medicinal Chemistry Project, Claremont, California 92711, USA, log P-databas och medicinsk-kemisk mjukvara (programmet CLOGP-3).

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

▼**M6**

(5) Leo, C. Hansch och D. Elkins. (1971) Partition coefficients and their uses. *Chemical Reviews*. 71, 525.

(6) R. F. Rekker och 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 och 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 och 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 Sociery, Washington, D.C. (1984).

▼M7

A.25 **DISSOCIATIONSKONSTANTER I VATTEN (TITRERINGS-METOD – SPEKTROFOTOMETRISK METOD – KONDUK-TOMETRISK METOD)**

INLEDNING

Den här testmetoden motsvarar OECD:s testriktlinje 112 (1981).

Förutsättningar

— Lämplig analysmetod

— Vattenlöslighet

Vägledande information

— Strukturformel

— Elektrisk ledningsförmåga för konduktometrisk metod

Kvalificerande angivelser

— Alla testmetoder kan utföras på rena eller kommersiellt producerade ämnen. Eventuella effekter av föroreningar på resultaten bör övervägas.

— Titreringsmetoden är inte lämplig för ämnen med låg löslighet (se testlösningar nedan).

— Den spektrofotometriska metoden är endast tillämplig på ämnen som har ett märkbart annorlunda UV/VIS-absorptionsspektrum för dissocierade och icke-dissocierade former. Denna metod kan även vara lämplig för ämnen med låg löslighet och för icke-syra/basdissociationer, t.ex. komplexbildning.

— I de fall där Onsager-ekvationen håller kan den konduktometriska metoden användas, även vid måttligt låga koncentrationer och även i händelse av icke-syra/basjämvikter.

Standarddokument

Denna testmetod är baserad på de metoder som anges i avsnittet ”Litteratur” och på dokumentet *Preliminary Draft Guidance for Premanufacture Notification EPA* av den 18 augusti 1978.

METOD – INLEDNING, SYFTE, OMFATTNING, RELEVANS, TILLÄMP-NING OCH TESTGRÄNSER

Ämnets dissociation i vatten är av betydelse för bedömningen av dess miljö-påverkan. Detta styr ämnets form, vilket i sin tur avgör hur det beter sig och överförs. Det kan påverka kemikaliens adsorption till jord och sediment och absorption in i biologiska celler.

Definitioner och enheter

Dissociation är en reversibel uppdelning i två eller flera kemiska ämnen som kan vara joniska. Processen anges vanligen genom

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

och koncentrationens jämviktskonstant som styr reaktionen är

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

I det särskilda fallet där R är väte (ämnet är en syra) är konstanten t.ex.

▼M7

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

eller

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

Referensämnen

Följande referensämnen behöver inte användas i samtliga fall när ett nytt ämne ska undersökas. Referensämnen tillhandahålls främst för att emellanåt kalibrera metoden och möjliggöra en jämförelse av resultaten när en annan metod tillämpas.

	pKa ([1])	Temp. i °C
p-nitrofenol	7,15	251
Bensoesyra	4,12	20
p-kloranilin	3,93	20

([1]) Inget värde för 20 °C är tillgängligt, men det kan antas att mätresultatets variationer är högre än det förväntade temperaturberoendet.

Här är det användbart att ha ett ämne med flera pK enligt avsnittet Testmetodens princip nedan. Exempel på sådana ämnen:

Citronsyra	pK_a (8)	Temp. i °C
	1) 3,14	20
	2) 4,77	20
	3) 6,39	20

Testmetodens princip

Den kemiska process som beskrivs är i allmänhet endast något temperaturberoende i det miljömässigt relevanta temperaturintervallet. Bestämningen av dissociationskonstanten kräver en mätning av koncentrationerna av det kemiska ämnets dissocierade och icke-dissocierade former. Med utgångspunkt från kunskapen om dissociationsreaktionens stökiometri enligt avsnittet Definitioner och enheter ovan kan den lämpliga konstanten bestämmas. I det särskilda fall som beskrivs i denna testmetod beter sig ämnet som en syra eller en bas, och bestämningen görs lämpligen genom att fastställa de relativa koncentrationerna av ämnets joniserade och icke-joniserade former och lösningens pH-värde. Förhållandet mellan dessa termer anges i ekvationen för pK_a i avsnittet Definitioner och enheter ovan. Vissa ämnen uppvisar mer än en dissociationskonstant och liknande ekvationer kan utvecklas. Några av de metoder som beskrivs här är också lämpliga för icke-syra/bas-dissociation.

Kvalitetskriterier

Repeterbarhet

Dissociationskonstanten bör replikeras (minst tre bestämningar) till inom ± 0,1 log-enheter.

BESKRIVNING AV TESTFÖRFARANDENA

Det finns två grundläggande metoder för bestämning av pK_a. Den ena metoden omfattar titrering av en känd mängd av ämnet med standardsyra eller standardbas i förekommande fall, och enligt den andra metoden bestäms den relativa koncentrationen av de joniserade och icke-joniserade formerna och deras pH-beroende.

▼M7

Förberedelser

Metoder som baseras på dessa principer kan klassificeras som titreringsförfaranden samt spektrofotometriska och konduktometriska förfaranden.

Testlösningar

För titreringsmetoden och den konduktometriska metoden ska det kemiska ämnet lösas upp i destillerat vatten. För den spektrofotometriska metoden och andra metoder används buffertlösningar. Koncentrationen av testämnet bör inte överstiga det mindre av 0,01 M eller halva mättnadskoncentrationen, och den renaste tillgängliga formen av ämnet bör användas för att bereda lösningarna. Om ämnet endast är måttligt lösligt kan det lösas i en liten mängd lösningsmedel som är blandbart i vatten innan de koncentrationer som anges ovan tillsätts.

Lösningarna bör kontrolleras med avseende på förekomst av emulsioner med hjälp av Tyndallstrålen, särskilt om ett hjälplösningsmedel har använts för att förbättra lösligheten. När buffertlösningar används bör bufferthalten inte överstiga 0,05 M.

Testbetingelser

Temperatur

Temperaturen bör regleras till minst ± 1 °C. Bestämningen bör företrädesvis utföras vid 20 °C.

Vid misstanke om betydande temperaturberoende bör bestämningen utföras åtminstone vid två andra temperaturer. I detta fall bör temperaturintervallen vara 10 °C och temperaturkontrollen ± 0,1 °C.

Analyser

Vilken metod som används beror på det testade ämnets natur. Metoden måste vara tillräckligt känslig för att möjliggöra bestämning av de olika kemiska beståndsdelarna vid varje testlösningskoncentration.

Testförfarande

Titreringsmetod

Testlösningen bestäms genom titrering med standardbas- eller standardsyralösning i förekommande fall, med mätning av pH-värdet efter varje tillsats av titreringsmedel. Minst tio stegvisa tillsatser bör göras före ekvivalenspunkten. Om jämvikt nås tillräckligt snabbt kan en registreringspotentiometer användas. För denna metod måste både den totala mängden av ämnet och dess koncentration vara exakt kända. Försiktighetsåtgärder måste vidtas för att utesluta koldioxid. Uppgifter om förfarande, försiktighetsåtgärder och beräkning ges i standardtesterna, t.ex. litteraturhänvisningarna (1), (2), (3), (4).

Spektrofotometrisk metod

En våglängd söks fram där de joniserade och icke-joniserade formerna av ämnet har avsevärt olika extinktionskoefficienter. UV-/VIS-absorptionsspektrumet erhålls från lösningar med konstant koncentration under ett pH-tillstånd där ämnet är i huvudsak icke-joniserat och helt joniserat och vid flera mellanliggande pH-värden. Detta kan antingen göras genom tillsats av omgångar av koncentrerad syra (bas) till en relativt stor mängd av en lösning av ämnet i en multikomponentbuffert, till en början vid högt (lågt) pH (litteraturhänvisning 5), eller genom tillsats av lika stora volymer av en stamlösning av ämnet i t.ex. vatten eller metanol, till konstanta volymer av olika buffertlösningar som täcker det önskade pH-intervallet. Från pH- och absorbansvärdena vid den valda våglängden beräknas ett tillräckligt antal värden för pK_a med hjälp av data från minst 5 pH där ämnet är joniserat till minst 10 procent och högst 90 procent. Ytterligare uppgifter om försöket och beräkningsmetoden anges i litteraturhänvisning (1).

▼M7

Konduktometrisk metod

Med användning av en cell med en liten och känd cellkonstant mäts ledningsförmågan hos en ca 0,1 M lösning av ämnet i konduktivitetslösning. Ledningsförmågan hos ett antal noggrant gjorda utspädningar av lösningen mäts också. Koncentrationen halveras varje gång och serien bör omfatta minst en storleksordning i koncentrationen. Den begränsande ledningsförmågan vid oändlig utspädning fastställs genom att ett liknande försök görs med Na-saltet och extrapolering. Dissociationsgraden kan sedan beräknas utifrån varje lösnings ledningsförmåga med hjälp av Onsager-ekvationen. Dissociationskonstanten kan beräknas med hjälp av Ostwalds utspädningslag, som $K = \alpha^2C / (1 – \alpha)$ där C är koncentrationen i mol per liter och α är den dissocierade fraktionen. Försiktighetsåtgärder måste vidtas för att utesluta koldioxid. Ytterligare uppgifter om försöket och beräkningsmetoden anges i standardtexter samt i litteraturhänvisningarna (1), (6) och (7).

DATA OCH RAPPORTERING

Behandling av resultaten

Titreringsmetod

pK_a beräknas för 10 uppmätta punkter på titreringskurvan. Medelvärdet och standardavvikelsen för sådana pK_a-värden beräknas. Ett diagram med pH avsatt mot volymerna av standardbas eller standardsyra bör ingå tillsammans med en presentation i tabellform.

Spektrofotometriska metoder

Absorbans och pH från varje spektrum ställs upp i tabellform. Minst fem värden för pK_a beräknas från de mellanliggande datapunkterna i spektrumet. Även medelvärde och standardavvikelse för dessa resultat beräknas.

Konduktometrisk metod

Motsvarande ledningsförmåga Λ beräknas för varje syrakoncentration och för varje koncentration av en blandning av en syraekvivalent och en 0,98 ekvivalent av karbonatfri natriumhydroxid. Syftet med överskottssyran är att förhindra överskott av OH^- på grund av hydrolys. $1 /\Lambda$ avsätts mot $\sqrt{C}$ och Λ_o av saltet bestäms genom extrapolering till nollkoncentration.

Λ_o av syran kan beräknas med användning av litteraturvärden för H^+ och Na^+. PKa kan beräknas från $\alpha = \Lambda_i / \Lambda o$ och $K_a = \alpha^2C/(1 – \alpha)$ för varje koncentration. Bättre värden för K_a kan fås genom korrigeringar för rörlighet och aktivitet. Medelvärde och standardavvikelser för PK_a-värden bör beräknas.

Testrapport

Alla rådata och beräknade PK_a-värden bör lämnas in tillsammans med beräkningsmetoden (företrädesvis i tabellformat, såsom föreslås i litteraturhänvisning 1), och detsamma gäller de statistiska parametrar som beskrivs ovan. För titreringsmetoder bör uppgifter om standardiseringen av titreringsmedel anges.

För den spektrofotometriska metoden bör samtliga spektrum anges. För den konduktometriska metoden bör uppgifter om bestämningen av cellkonstant rapporteras. Uppgifter om använd teknik samt analysmetoder och typen av eventuella buffertar bör också lämnas.

Testtemperaturer ska rapporteras.

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, s. 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, (mars 1973).

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

(7) Standard Method 205 – APHA/AWWA/NPCF (se ovan (4)).

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

▼B

DEL B: METODER FÖR BESTÄMNING AV TOXICITET OCH ANDRA HÄLSOEFFEKTER

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

ALLMÄN INLEDNING

B.1a AKUT TOXICITET (ORALT) – METOD MED FASTA SÄRSKILJANDE DOSER

B.1b AKUT TOXICITET ORALT – METOD FÖR BESTÄMNING AV AKUT TOXICITETSKLASS

B.2 AKUT INHALATIONSTOXICITET

B.3 AKUT TOXICITET (DERMALT)

B.4 AKUT TOXICITET: HUDIRRITATION/HUDKORROSION

B.5 AKUT ÖGONIRRITATION/ÖGONKORROSION

B.6 HUDSENSIBILISERING

B.7 28-DAGARS TOXICITETSSTUDIE MED UPPREPAD ORAL DOSERING PÅ GNAGARE

B.8 SUBAKUT INHALATIONSTOXICITET: 28-DAGARS STUDIE

B.9 TOXICITET VID UPPREPAD DOSERING (28 DAGAR, DERMALT)

B.10 TEST IN VITRO AV KROMOSOMAVVIKELSER HOS DÄGGDJUR

B.11 TEST AV KROMOSOMAVVIKELSER I BENMÄRG HOS DÄGGDJUR

B.12 MIKROKÄRNTEST AV ERYTROCYTER HOS DÄGGDJUR

B.13/14 MUTAGENICITET – TEST AV ÅTERMUTATION HOS BAKTERIER

B.17 MUTAGENICITET – TEST AV GENMUTATIONER HOS DÄGGDJURSCELLER IN VITRO

B.21 CELLTRANSFORMATIONSTEST PÅ DÄGGDJURSCELLER *IN VITRO*

B.22 DOMINANT LETAL TEST PÅ GNAGARE

▼B

B.23	SPERMATOGENIAL TEST AV KROMOSOMAVVIKELSER HOS DÄGGDJUR
B.25	TEST AVSEENDE ÄRFTLIG TRANSLOKATION PÅ MUS
B.26	TEST AVSEENDE SUBKRONISK ORAL TOXICITET (90-DAGARS UPPREPAT ORALTEST PÅ GNAGARE)
B.27	TEST AVSEENDE SUBKRONISK ORAL TOXICITET (90-DAGARS UPPREPAT ORALTEST PÅ ICKE-GNAGARE)
B.28	TEST AVSEENDE SUBKRONISK DERMAL TOXICITET (90-DAGARS REPETERAD DERMALTEST PÅ GNAGARE)
B.29	SUBKRONISK INHALATIONSTOXICITET: 90-DAGARSSTUDIE
B.30	STUDIER AV KRONISK TOXICITET
B.31	TEST AVSEENDE PRENATAL UTVECKLINGSTOXICITET
B.32	KARCINOGENICITETSSTUDIER
B.33	KOMBINERAD KRONISK TOXICITETS-/KARCINOGENICITETSSTUDIE
B.34	REPRODUKTIONSTOXICITETSTEST PÅ EN GENERATION
B.35	TEST AVSEENDE REPRODUKTIONSTOXICITET PÅ TVÅ GENERATIONER
B.36	TOXIKOKINETIK
B.37	FÖRDRÖJD NEUROTOXICITET ORSAKAD AV ORGANISKA FOSFORFÖRENINGAR TILL FÖLJD AV AKUT EXPONERING
B.38	FÖRDRÖJD NEUROTOXICITET ORSAKAD AV ORGANISKA FOSFORFÖRENINGAR (28 DAGARS UPPREPAD DOS-UNDERSÖKNING)
B.39	TEST AV REPARATIONSSYNTES (uds) HOS LEVERCELLER FRÅN DÄGGDJUR *IN VIVO*
B.40	*IN VITRO*-TEST AV HUDKORROSIVITET: BESTÄMNING AV TRANSKUTANT ELEKTRISKT MOTSTÅND (TER)
B.40a	*IN VITRO*-TEST AV HUDKORROSIVITET: TEST MED MODELL AV HUMAN HUD
B.41	3T3 NRU-FOTOTOXICITETSTEST *IN VITRO*
B.42	HUDSENSIBILISERING: LLNA-METODEN (LOCAL LYMPH NODE ASSAY)

▼B

B.43	TEST AVSEENDE NEUROTOXICITET PÅ GNAGARE
B.44	HUDABSORPTION: *IN VIVO*-METOD
B.45	HUDABSORPTION: *IN VITRO*-METOD
B.46	*IN VITRO*-HUDIRRITATION: TESTMETOD MED REKONSTRUERAD HUMAN HUD
B.47	TESTMETODEN BCOP (BOVINE CORNEAL OPACITY AND PERMEABILITY) FÖR IDENTIFIERING AV I) KEMIKALIER SOM ORSAKAR ALLVARLIG ÖGONSKADA OCH II) KEMIKALIER FÖR VILKA DET INTE KRÄVS KLASSIFICERING FÖR ÖGONIRRITATION ELLER ALLVARLIG ÖGONSKADA
B.48	TESTMETODEN ICE (ISOLATED CHICKEN EYE TEST) FÖR IDENTIFIERING AV I) KEMIKALIER SOM ORSAKAR ALLVARLIG ÖGONSKADA OCH II) KEMIKALIER FÖR VILKA DET INTE KRÄVS KLASSIFICERING FÖR ÖGONIRRITATION ELLER ALLVARLIG ÖGONSKADA
B.49	MIKROKÄRNTEST AV DÄGGDJURSCELLER IN VITRO
B.50	HUDSENSIBILISERING: LLNA-METODEN (LOCAL LYMPH NODE ASSAY): DA
B.51	HUDSENSIBILISERING: LLNA-METODEN (LOCAL LYMPH NODE ASSAY): BrdU-ELISA
B.52	AKUT INHALATIONSTOXICITET – AKUT TOXICITETSKLASS
B.53	STUDIE AV UTVECKLINGSNEUROTOXICITET
B.54	UTEROTROF BIOASSAY PÅ GNAGARE: ETT KORTTIDSSCREENINGTEST FÖR ÖSTROGENA EGENSKAPER
B.55	HERSHBERGERS BIOASSAY PÅ RÅTTA: ETT KORTTIDSSCREENINGTEST FÖR (ANTI)ANDROGENA EGENSKAPER
B.56	UTÖKAD ENGENERATIONSSTUDIE AV REPRODUKTIONSTOXICITET
B.57	H295R STEROIDOGENESTEST
B.58	GENMUTATIONSTESTER I SOMATISKA CELLER OCH KÖNSCELLER HOS TRANSGENA GNAGARE
B.59	HUDSENSIBILISERING IN CHEMICO: DIRECT PEPTIDE REACTIVITY ASSAY (DPRA)
B.60	HUDSENSIBILISERING IN VITRO: TESTMETODEN ARE-NRF2-UCIFERAS
B.61	TESTMETODEN FLUORESCEINLÄCKAGE FÖR IDENTIFIERING AV ÄMNEN SOM ÄR FRÄTANDE OCH KRAFTIGT IRRITERANDE FÖR ÖGONEN
B.62	ALKALINE COMET ASSAY IN VIVO PÅ DÄGGDJUR

▼B

ALLMÄN INLEDNING

A. **BESKRIVNING AV TESTSUBSTANSEN**

Testsubstansens sammansättning, inbegripet de viktigaste orenheterna, och dess relevanta fysikaliskt-kemiska egenskaper, inbegripet ämnets stabilitet, ska vara kända innan en toxicitetsundersökning inleds.

Testsubstansens fysikaliskt-kemiska egenskaper ger viktig vägledning vid val av tillförselväg, utformning av varje enskild undersökning samt hantering och lagring av testsubstansen.

En analysmetod för kvalitativ och kvantitativ bestämning av testsubstansen (om möjligt inbegripet viktiga orenheter) i doseringsmediet och i biologiska material bör utvecklas innan en undersökning inleds.

Alla uppgifter om identifiering av testsubstansen, dess fysikaliskt-kemiska egenskaper, renhet och beteende bör omfattas av testrapporten.

B. **DJURVÅRD**

En strikt kontroll av miljöförhållandena samt tillämpliga djurvårdsmetoder är grundläggande i fråga om toxicitetstester.

i) *Förvaltningsförhållanden*

Miljön i försöksdjurens rum eller burar ska vara avpassade efter djurarten. Lämpliga betingelser för råttor, möss och marsvin är en rumstemperatur på 22 ±3 °C med en relativ luftfuktighet på 30 – 70 %. För kaniner och marsvin bör temperaturen hållas vid 20 ±3 °C med en relativ luftfuktighet på 30 – 70 %.

Vissa testmetoder är särskilt känsliga för temperatureffekter och i dessa fall ingår detaljuppgifter om lämpliga betingelser i metodbeskrivningen. I alla undersökningar av toxiska effekter ska temperaturen och luftfuktigheten kontrolleras, registreras och anges i den slutliga testrapporten.

Artificiell belysning bör användas, med en dygnsrytm på 12 timmar ljus, 12 timmar mörker. Detaljuppgifter om belysningsrytmen ska registreras och anges i den slutliga testrapporten.

Om inte annat anges för metoden får djuren inhysas individuellt eller i små grupper av samma kön; i fråga om grupper bör högst fem djur inhysas i varje bur.

I rapporter om djurförsök är det viktigt att ange vilken typ av bur som används och antalet djur i varje bur, både under exponering för det kemiska ämnet och under en påföljande observationstid.

▼B

ii) *Utfodring*

Fodret ska uppfylla alla näringsmässiga krav som kan ställas för den djurart som används i försöket. Om testsubstansen tillförs djuren via fodret kan näringsvärdet sjunka till följd av en samverkan mellan ämnet och någon beståndsdel i fodret. Möjligheten av en sådan reaktion ska övervägas vid tolkningen av testresultaten. Konventionellt laboratoriefoder får användas tillsammans med obegränsade mängder vatten. Valet av foder kan påverkas av behovet av att säkerställa en lämplig blandning med testsubstansen när denna tillförs enligt denna metod.

I fodret får inte finnas störande koncentrationer av föroreningar som man vet påverkar toxiciteten.

C. **ALTERNATIVA TESTER**

För Europeiska unionen är det ett åtagande att främja utvecklandet och valideringen av alternativa metoder som kan ge samma informationsnivå som nuvarande djurförsök, men som använder färre djur, orsakar mindre lidande eller undviker användning av djur fullständigt.

När sådana metoder blir tillgängliga ska de om möjligt beaktas för riskbedömning och efterföljande klassificering och märkning av eventuella risker.

D. **UTVÄRDERING OCH TOLKNING**

När tester utvärderas och tolkas ska begränsningarna för i vilken utsträckning resultaten av djurförsök och *in vitro*-undersökningar går att tillämpa på människor beaktas och därför får bevis för negativa effekter på människor i förekommande fall användas som bekräftelse av testresultaten.

E. **LITTERATURHÄNVISNINGAR**

De flesta av dessa metoder har utvecklats inom ramen för OECD:s program för riktlinjer för tester och bör utföras i enlighet med principerna för god laboratoriepraxis, i syfte att så långt möjligt säkerställa ”ömsesidigt godtagande av uppgifter”.

Ytterligare information finns i de hänvisningar som görs i OECD:s riktlinjer och relevant litteratur som publicerats på annat håll.

▼B

B.1a AKUT TOXICITET (ORALT) – METOD MED FASTA SÄRSKILJANDE DOSER

1. METOD

Denna testmetod motsvarar OECD TG 420 (2001).

1.1 INLEDNING

Vid traditionella metoder för bedömning av akut toxicitet används djurens död som slutpunkt. 1984 föreslog British Toxicology Society en ny metod för test avseende akut toxicitet. Den nya metoden bygger på att djuren ges en serie doser på definierade nivåer (se hänvisning 1). Då behöver djurens död inte användas som slutpunkt, eftersom metoden bygger på observationer av klara tecken på toxicitet vid någon av de definierade dosnivåerna. Efter brittiska och internationella (se hänvisning 2 respektive 3) valideringsstudier *in vivo* 1992 detta förfarande som en testmetod. Därefter har metodens statistiska egenskaper utvärderats med hjälp av matematiska modeller i en serie studier (se hänvisning 4, 5, och 6). Med hjälp av dessa *in vivo*- och modelleringsstudier har man kunnat demonstrera att metoden är reproducerbar, kräver ett mindre antal djur och orsakar mindre lidande än de traditionella metoderna, och att metoden även gör det möjligt att klassificera ämnen på ett liknande sätt som med de övriga testmetoderna för akut toxicitet.

Riktlinjer för valet av den lämpligaste testmetoden för ett visst ändamål finns i vägledningen om testning av akut toxicitet oralt (se hänvisning 7). I vägledningen finns även tilläggsinformation rörande utförandet av testmetod B.1b och tolkningen av resultaten.

Metoden bygger på principen om att endast skäligen toxiska doser används i huvudtestet, och att doser som förväntas vara dödliga ska undvikas. Doser som, på grund av frätande eller allvarligt irriterande verkningar, är kända att orsaka klar smärta och svårt lidande behöver inte användas. Döende djur eller djur som uppvisar klara tecken på smärta eller allvarligt och ihållande lidande ska avlivas skonsamt, och vid tolkningen av testresultaten ska dessa djur beaktas på samma sätt som djur som har dött under testets gång. Kriterierna för beslut rörande avlivning av döende eller svårt lidande djur, liksom även riktlinjer för tecknen på förutsägbar eller annalkande död, behandlas i en separat vägledning (se hänvisning 8).

Metoden ger information om ett ämnes farliga egenskaper och möjliggör klassificering av ämnet enligt det globala harmoniserade systemet (GHS) för klassificering av kemikalier som orsakar akut toxicitet (se hänvisning 9).

Testningslaboratoriet bör analysera all tillgänglig information om testämnet innan själva testningen genomförs. Sådan information inbegriper ämnets identitet och kemiska struktur, fysikalkemiska egenskaper, resultaten från andra eventuella *in vitro*- eller *in* vivo-test avseende toxicitet, toxikologiska data om strukturellt närbesläktade ämnen och ämnets tilltänkta användningsändamål. Denna information behövs för att avgöra huruvida testet är relevant för skyddet av människors hälsa, och hjälper vid valet av en optimal startdos.

▼B

1.2 DEFINITIONER

Akut toxicitet (oralt): De skadliga verkningar som uppträder efter oral tillförsel av en engångsdos av ett ämne eller upprepade doser som ges inom 24 timmar.

Fördröjd död: Det att ett djur inte dör eller är döende inom 48 timmar, men dör senare under den 14 dagar långa observationsperioden.

Dos: Den mängd testämne som tillförs. Dosen uttrycks som vikten testämne per viktenhet försöksdjur (exempelvis mg/kg).

Uppenbar toxicitet: En allmän term för att beskriva klara tecken på toxicitet efter tillförsel av testämnet (exempel finns i hänvisning 3). Verkningarna är då så allvarliga att närmaste högre dos troligen leder till att största delen av djuren utsätts för svår smärta eller uppvisar ihållande tecken på allvarligt lidande, är döende (kriterierna anges i vägledningen om konsekvenser för människor, se hänvisning 8) eller sannolikt dör.

GHS: Globala harmoniserade systemet för klassificering och märkning av kemikalier och blandningar. Systemet utarbetas gemensamt inom OECD (människors hälsa och miljö), FN:s expertkommitté om transport av farligt gods (fysikalkemiska egenskaper) och ILO (varningar). Samordningen sker genom det gemensamma programmet för sund kemikaliehantering (IOMC).

Annalkande död: När ett djur troligen är döende eller har dött före den nästa planenliga observationstidpunkten. Hos gnagare kan tecknen på annalkande död inbegripa konvulsioner, lateral kroppsställning, halvliggande ställning och tremor (närmare uppgifter finns i vägledning om konsekvenserna för människor, se hänvisning 8).

LD_{50} (median letal dos): En statistiskt fastställd engångsdos som kan förväntas leda till döden för 50 % av de djur som har tillförts dosen oralt. LD_{50}-värdet uttrycks som vikten testämne per viktenhet försöksdjur (mg/kg).

Gränsdos: En dos på den övre gränsnivån (2 000 eller 5 000 mg/kg).

Döende djur: Ett djur som håller på att dö eller som har små chanser att överleva, även om det får behandling (närmare uppgifter finns i vägledningen om konsekvenserna för människors hälsa, se hänvisning 8).

Förutsägbar död: Förekomsten av kliniska tecken som tyder på död vid en känd framtida tidpunkt som infaller före försökets planerade avslutningstidpunkt, exempelvis oförmåga att nå vatten eller föda (närmare uppgifter finns i vägledningen om konsekvenserna för människors hälsa, se hänvisning 8).

▼B

man når den dos som orsakar uppenbar toxicitet eller ett dödsfall, eller tills inga verkningar kan iakttas på den högsta dosnivån eller dödsfall inträffar på den lägsta dosnivån.

1.4 BESKRIVNING AV TESTMETODEN

1.4.1 **Val av djurart**

Rekommenderad gnagare är råtta, även om testet kan utföras med andra gnagare. I regel används hondjur (se hänvisning 7). Detta beror på att litteraturstudier av konventionella LD_{50}-test indikerar att känslighetsskillnaderna mellan könen är små, men att honorna i förekommande fall ofta är en aning mer känsliga (se hänvisning 10). Om däremot kunskaperna om strukturellt närbesläktade ämnens toxikologiska eller toxiko-kinetiska egenskaper tyder på att hanarna sannolikt är känsligare än honorna bör hanar användas. Om testet görs på hanar bör tillbörlig motivering ges.

Djuren bör vara unga och friska vuxna exemplar som härrör från normala laboratoriestammar. Hondjuren får inte ha fött ungar och får inte vara dräktiga. När dostillförseln inleds ska djuret vara mellan 8 och 12 veckor gammalt, och variationerna i vikt får vara högst ± 20 % av medelvikten för alla tidigare djur som har doserats.

1.4.2 **Förvarings- och utfodringsbetingelser**

Temperaturen i testdjurens utrymmen bör vara 22 °C (± 3 °C). Den relativa fuktigheten bör vara minst 30 % och ska helst inte överstiga 70 %, utom när rummet rengörs. Målvärdet bör dock vara 50–60 %. Belysningen bör vara artificiell med omväxlande 12 timmar ljus och 12 timmar mörker. För utfodringen kan konventionellt laboratoriefoder användas, och djuren bör ha obegränsad tillgång till dricksvatten. Djur som tillförs doser på samma nivå kan inhysas i samma bur, men antalet djur per bur får inte vara högre än att klara observationer kan göras av varje djur.

1.4.3 **Förberedelse av djuren**

Djuren väljs ut slumpmässigt och förses med märkning så att de kan identifieras individuellt Därefter får djuren acklimatisera sig till laboratoriets betingelser i sina burar i minst 5 dagar före doseringsstart.

▼B

1.4.4 **Förberedelse av doserna**

I regel ska de olika doserna av testämnet tillföras i en konstant volym, vilket innebär att doserna har varierande koncentration. När en slutprodukt i vätskeform eller en blandning testas, kan det med tanke på riskbedömningen vara mer relevant att använda testämnet i outspädd form (konstant koncentration), vilket även förutsätts av vissa tillsynsmyndigheter. Den maximala dosvolymen för tillförsel får aldrig överskridas. Den största mängd vätska som kan tillföras vid ett och samma tillfälle beror på testdjurets storlek. För gnagare bör denna volym i regel inte överskrida 1 ml per 100 g kroppsvikt. I fråga om vattenlösningar får dock 2 ml per 100 g kroppsvikt användas. För tillförsel av dosen rekommenderas alltid i första hand lösning, suspension eller emulsion i vatten, sedan lösning, suspension eller emulsion i olja (exempelvis majsolja) och därefter eventuella andra vehiklar. I fråga om andra vehiklar än vatten måste de toxikologiska egenskaperna vara kända. Doserna måste beredas strax före tillförseln, utom i fall där preparatets stabilitet är känd och har påvisats vara godtagbar över hela användningsperioden.

1.5 FÖRFARANDE

1.5.1 **Tillförsel av doser**

Testämnet tillförs som en engångsdos genom sondmatning med hjälp av magsond eller lämplig intubationskanyl. I det sällsynta fallet att det inte är möjligt med en engångsdos, kan dosen tillföras i mindre delar över en period som inte överskrider 24 timmar.

Före dostillförseln hålls djuren fastande (utan föda och med tillgång till vatten, för råttor över natten och för möss i 3–4 timmar). Efter fasteperioden vägs djuren och testämnet tillförs. Efter tillförsel av ämnet kan djuren hållas utan föda i ytterligare 3–4 timmar (råttor) respektive 1–2 timmar (möss). Om dosen tillförs i delar över en tidsperiod kan det vara nödvändigt att ge djuren föda och vatten, beroende på periodens längd.

1.5.2 **Inledande test**

Avsikten med ett inledande test är att få en grund för valet av optimal startdos för huvudtestet. Testämnet tillförs enskilda djur enligt den sekvens som anges i flödesschemat i bilaga 1. Det inledande testet kan avslutas när sekvensen når fram till ett utfall om en startdos för huvudtestet (eller om ett djur dör på den lägsta angivna dosnivån).

Som startdos för det inledande testet väljs en av de angivna dosnivåerna 5, 50, 300 och 2 000 mg/kg. Startdosen väljs så att den troligen ger tecken på uppenbar toxicitet, och den ska i mån av möjlighet grunda sig på resultat från *in vivo*- och *in* vitro-test av samma kemikalie och strukturellt närbesläktade kemikalier. Om sådan information inte finns att tillgå, används startdosen 300 mg/kg.

Det bör gå minst 24 timmar från doseringen av att djur till doseringen av följande djur. Alla djur bör observeras i minst 14 dagar.

▼B

Undantagsvis, och endast när det kan motiveras med specifika tillsynskrav, får en ytterligare högre dosnivå på 5 000 mg/kg användas (se bilaga 3). Med hänsyn till djurens välbefinnande avråds testning på djur när det gäller GHS-kategori 5 (2 000–5 000 mg/kg). Sådan testning får endast göras när det finns en stark sannolikhet för att resultaten har en direkt relevans för skyddet av djurs eller människors hälsa eller av miljön.

I ett inledande test där ett djur dör vid den lägsta dosnivån (5 mg/kg), bör förfarandet i regel avslutas och ämnet klassificeras som tillhörande GHS-kategori 1 (se bilaga 1). Om det ändå behövs ytterligare bekräftelse av klassificeringen kan ett valfritt tilläggsförfarande genomföras. Detta går ut på att ett andra djur doseras vid nivån 5 mg/kg. Om detta andra djur dör, anses GHS-kategorin 1 vara bekräftad och testet avslutas omedelbart. Om det andra djuret överlever doseras högst tre tilläggsdjur vid nivån 5 mg/kg. Eftersom mortalitetsrisken är hög bör dessa djur av hänsyn till djurens välbefinnande doseras sekventiellt. Efter doseringen av ett djur får följande djur inte doseras förrän det är klart att det tidigare djuret sannolikt överlever. Om något av dessa djur dör ska doseringssekvensen omedelbart avslutas, och inga ytterligare djur ska doseras. Eftersom förekomsten av ett dödsfall till (oavsett hur många djur som har testats vid testets slut) leder till utfall A (två eller flera dödsfall), ska klassificeringen enligt bilaga 2 göras för dosen 5 mg/kg (kategori 1 om det förekommit två eller flera dödsfall eller kategori 2 om det inte förekommit fler än ett dödsfall). Dessutom innehåller bilaga 4 vägledning om klassificeringen enligt EU-systemet, som gäller tills det att det nya GHS-systemet har genomförts.

1.5.3 **Huvudtest**

1.5.3.1 *Antalet djur och dosnivåer*

I flödesschemat i bilaga 2 anges de steg som bör följas efter testning vid startdosnivå. Ett av tre steg måste tas – avsluta testet och riskklassificera ämnet på grundval av utfallet, testa vid en högre dosnivå eller testa vid en lägre dosnivå. Med hänsyn till djurens välbefinnande bör dosnivåer som har orsakat dödsfall i det inledande testet inte användas i huvudtestet (se bilaga 2). Erfarenheterna tyder på att det mest sannolika utfallet vid startdosnivån är att ämnet kan klassificeras och att ingen ytterligare testning behövs.

I regel används totalt fem djur av samma kön vid varje dosnivå. Dessa fem djur inbegriper det djur som i det inledande testet doserades vid den valda nivån och därutöver fyra djur (utom, i undantagsfall, om en dosnivå som används i huvudtestet inte har ingått i det inledande testet).

Tidsintervallet mellan doseringen vid varje nivå bestäms av start, varaktighet och allvarlighetsgrad för de toxiska tecknen. Doseringen av djuren på följande dosnivå bör inte inledas förrän det råder säkerhet om de tidigare doserade djurens överlevnad. I förekommande fall rekommenderas ett intervall på 3–4 dagar mellan doseringen vid de olika nivåerna, så att eventuella tecken på fördröjd toxicitet kan observeras. Tidsintervallet kan anpassas på tillbörligt sätt, exempelvis i fall där responsen är tvetydig.

▼B

I fall där man överväger att använda en övre dos på 5 000 mg/kg bör förfarandet enligt bilaga 3 följas (se även avsnitt 1.6.2).

1.5.3.2 *Gränstest (limit test)*

Gränstest används primärt i situationer där laboratoriet har information som tyder på att testämnet sannolikt inte är toxiskt (toxiskt endast ovanför de gränsdoser som anges i bestämmelser). Information om testämnets toxicitet kan härledas från kunskaperna om liknande testade ämnen eller liknande testade blandningar eller produkter, med hänsyn tagen till identiteten och halten av de komponenter som har känd toxikologisk signifikans. Om informationen om ämnets toxicitet är bristfällig eller saknas, eller om ämnet troligen är toxiskt, bör huvudtestet genomföras.

Som gränstest för den metod som beskrivs här kan man använda ett inledande test med en startdos på 2 000 mg/kg (eller undantagsvis 5 000 mg/kg) som åtföljs av dosering av ytterligare fyra djur vid denna nivå.

1.6 OBSERVATIONER

Efter doseringen observeras djuren individuellt minst en gång under de första 30 minuterna, periodiskt under de första 24 timmarna (med särskild uppmärksamhet under de första 4 timmarna) och därefter dagligen under totalt 14 dagar. Detta gäller inte för djur som av hänsyn till djurens välbefinnande måste avlivas skonsamt eller för djur som hittas döda. Observationsperiodens längd bör dock ha en anpassningsmån. Längden bör bestämmas enligt de toxiska reaktionerna, tidpunkten för när de sätter in och återhämtningsperiodens längd. Observationsperioden kan således förlängas om det anses vara nödvändigt. Tidpunkten då tecken på toxicitet uppträder och försvinner är viktig, särskilt om de toxiska tecknen tenderar att vara fördröjda (se hänvisning 11). Alla observationer registreras systematiskt, med individuella registreringar för varje djur.

Tilläggsobservationer behövs om djuren fortsätter att uppvisa tecken på toxicitet. Observationerna bör omfatta ändringar i hud och päls, ögon och slemhinnor samt även andningsorganen, cirkulationsorganen och det autonoma och centrala nervsystemet. Likaså bör den somatomotoriska aktiviteten och beteendemönstret observeras. Uppmärksamhet bör fästas vid observationer av tremor, konvulsioner, salivutsöndring, diarré, letargi, sömn och koma. Hänsyn bör tas till de principer och kriterier som anges i vägledningen om konsekvenserna för människor (se hänvisning 8). Djur som befinns vara döende och djur som visar tecken på svår smärta eller ihållande lidande bör avlivas skonsamt. I fall där djur avlivas av hänsyn till djurens välbefinnande eller hittas döda, bör tidpunkten för dödsfallet registreras så exakt som möjligt.

1.6.1 **Kroppsvikt**

Djurens individuella vikter bör registreras strax innan testämnet tillförs och därefter minst en gång per vecka. Alla viktändringar bör bestämmas och registreras. Vid testets slut vägs alla överlevande djur och därefter avlivas de skonsamt.

▼B

1.6.2 **Patologi**

Alla försöksdjur (inbegripet de som dött under testet eller som har avlivats av hänsyn till djurens välbefinnande) bör obduceras. Alla betydande patologiska förändringar bör registreras för varje djur. Användbar information kan även fås genom mikroskopundersökning av organ som uppvisar betydande skador och som härrör från djur som överlevt minst 24 timmar efter tillförsel av startdosen.

2. **DATA**

Data bör rapporteras individuellt per djur. Dessutom bör alla data sammanställas i tabellform. Tabellen ska för varje testgrupp visa antalet djur som använts, antalet djur som uppvisat tecken på toxicitet, antalet djur som under testets gång har dött eller avlivats av hänsyn till djurens välbefinnande, tidpunkterna för alla individuella dödsfall, en beskrivning av och förloppet för de toxiska verkningarna och deras reversibilitet samt obduktionsfynd.

3. **RAPPORTERING**

3.1 TESTRAPPORT

Testrapporten ska innehålla nedan angivna uppgifter, enligt det som är relevant:

Testämne:

— Fysikalisk natur, renhet och, där det är relevant, fysikalkemiska egenskaper (inbegripet isomerisering).

— Identifieringsdata, inbegripet CAS-nummer.

Vehikel (i förekommande fall).

— Motivering för val av vehikel, om annan än vatten.

Försöksdjur:

— Art och stam som använts.

— Mikrobiologiska data för djuren, om dessa data är kända.

— Antalet djur, deras ålder och kön (och i förekommande fall en motivering för användning av hanar i stället för honor).

— Ursprung, förvaringsförhållanden, foder och dylikt.

Testbetingelser:

— Detaljerade uppgifter om testämnets sammansättning, inbegripet uppgifter om den tillförda dosens fysikaliska form.

— Uppgifter om hur testämnet har tillförts, inbegripet dosens volym och doseringstidpunkt.

— Detaljerade uppgifter om foder- och vattenkvalitet (inbegripet diettyp/källa, vattenkälla).

— Motivering för valet av startdos.

▼B

Resultat:

— En tabell med responsdata och dosnivå för varje djur (djur som uppvisat tecken på toxicitet samt mortalitet, verkningarnas art, allvarlighetsgrad och varaktighet).

— Tabell med kroppsvikt och förändringar av kroppsvikt.

— Djurens individuella vikt på doseringsdagen och därefter med en veckas intervall, samt tidpunkten för dödsfall eller avlivning.

— Datum och tidpunkt för dödsfall som inträffat före den planenliga avlivningen.

— Tidsförloppet för när tecken på toxicitet sätter in och huruvida tecknen är reversibla, för varje djur.

— Obduktionsfynd och histopatologiska fynd för varje djur, i förekommande fall.

Diskussion och tolkning av resultaten.

Slutsatser.

4. **HÄNVISNINGAR**

1. British Toxicology Society Working Party on Toxicity (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. M. J. Van den Heuvel, A.D. Dayan och R.O. Shillaker (1987), ”Evaluation of the BTS approach to the testing of substances and preparations for their acute toxicity”, *Human Toxicol.,* 6, 279–291.

3. M. J. Van den Heuvel, D.G. Clark, R.J. Fielder, P.P. Koundakjian, G.J.A. Oliver, D. Pelling, N.J. Tomlinson och A.P. Walker (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. A. Whitehead och R.N. Curnow (1992), ”Statistical evaluation of the fixed-dose procedure”, *Fd. Chem.Toxicol.,* 30, 313–324.

5. N. Stallard och A. Whitehead (1995), ”Reducing numbers in the fixed-dose procedure”, *Human Exptl.Toxicol.,* 14, 315–323.

6. Stallard, N., Whitehead, A. and Ridgeway, P. (2002), Statistical evaluation of the revised fixed dose pro cedure. Hum. Exp. Toxicol., 21, 183–196.

7. OECD (2001), ”Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing”, *Environmental Health and SafetyMonograph Series on Testing and Assessment,* 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 SafetyMonograph Series on Testing and Assessment,* 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”, s. 11 (http://webnet1.oecd.org/oecd/ pages/home/displaygeneral/0,3380,EN-documents-521-14-no-24-no-0,FF.html).

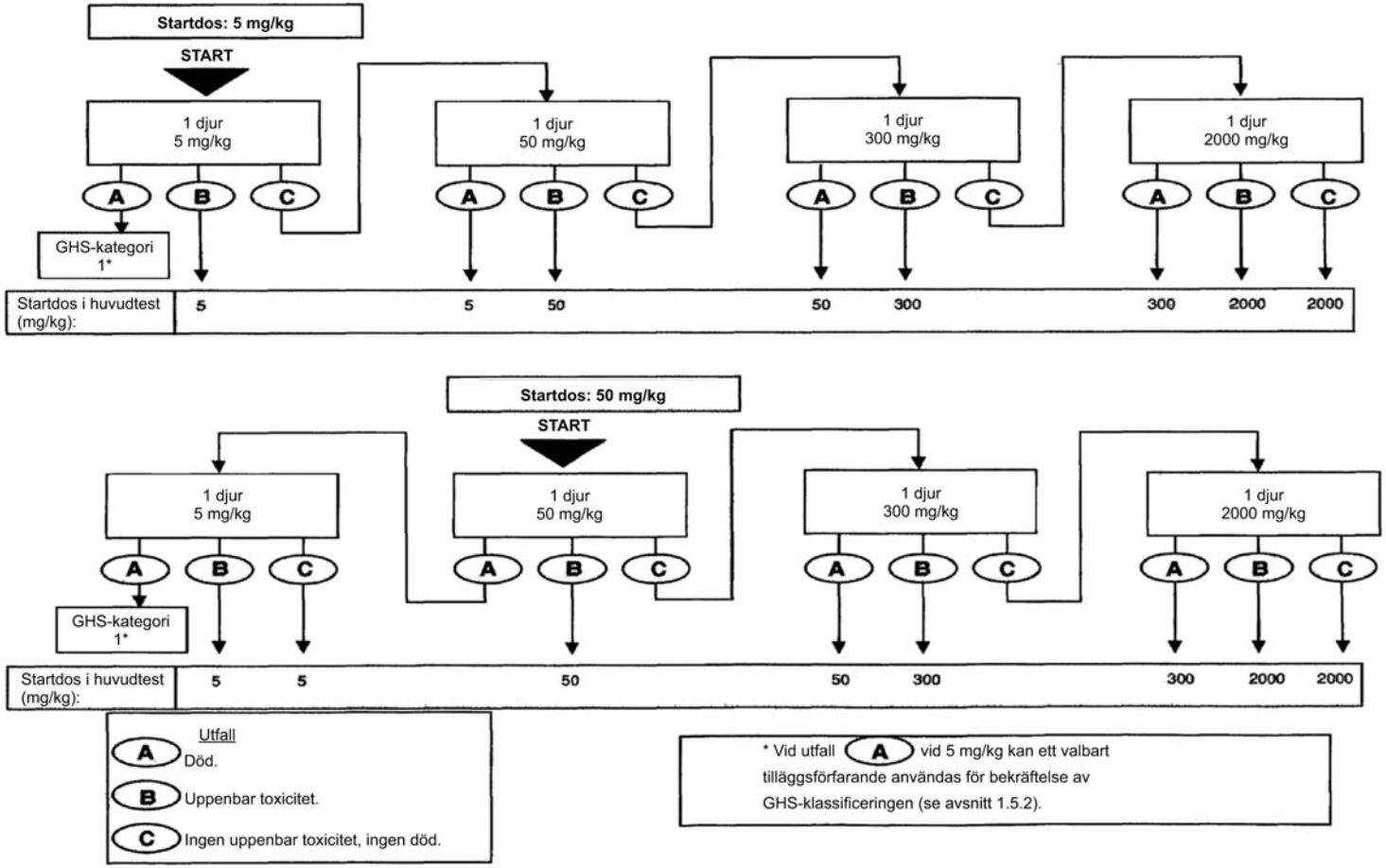
10. R.L. Lipnick, J.A. Cotruvo, R.N. Hill, R.D. Bruce, K.A. Stitzel, A.P. Walker, I. Chu, M. Goddard, L. Segal, J.A. Springer och R.C. Myers (1995), ”Comparison of the Up-and-Down, Conventional LD_{50}, and Fixed-Dose Acute Toxicity Procedures”, *Fd. Chem. Toxicol.,* 33, 223–231.

11. P.K Chan och A.W. Hayes (1994), ”Chapter 16 Acute Toxicity and Eye Irritation, *Principles and Methodsof Toxicology*”, 3rd Edition, red. A.W. Hayes, Raven Press, Ltd. New York, USA.

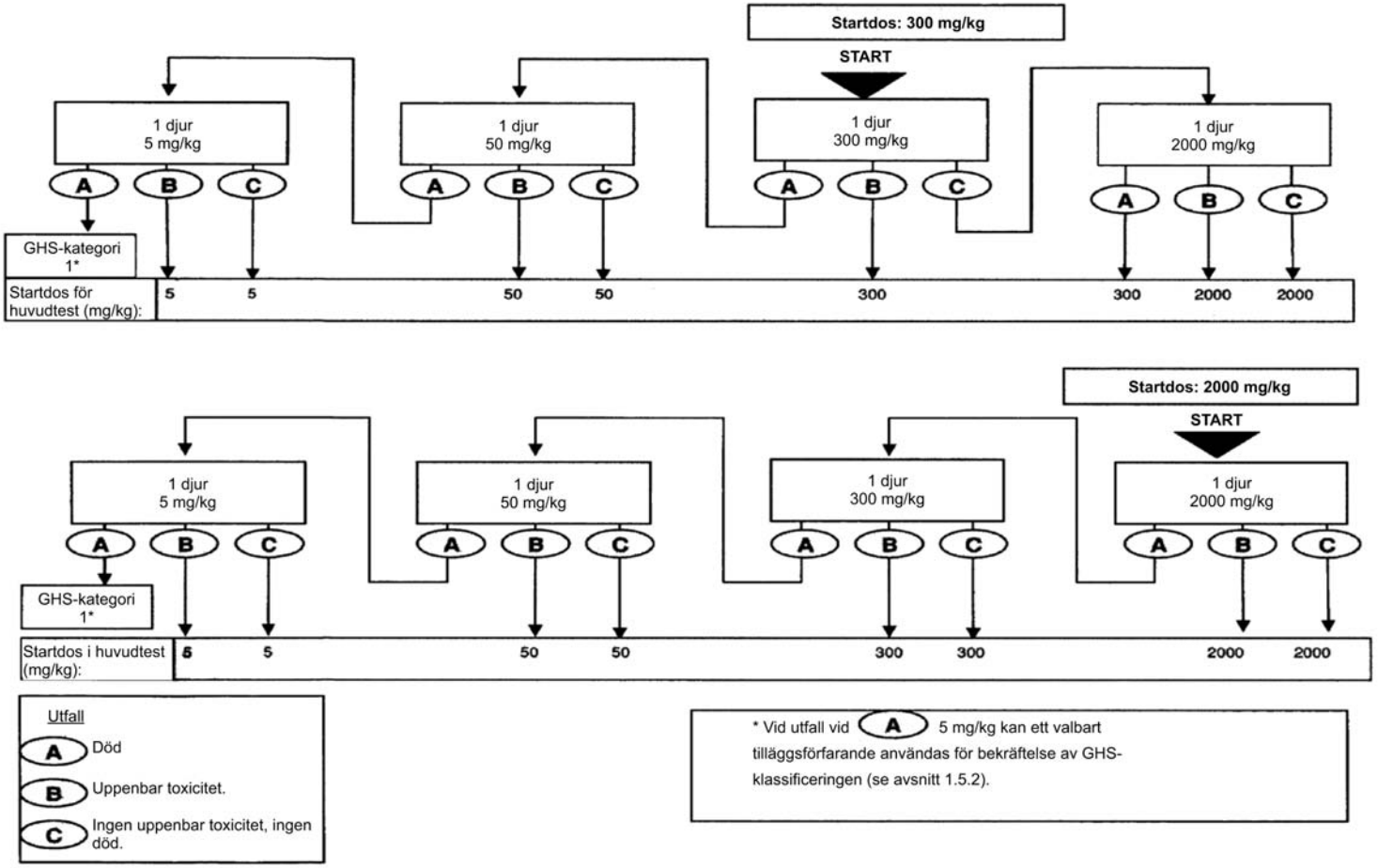
▼B

Bilaga 1

FLÖDESSCHEMA FÖR INLEDANDE TEST



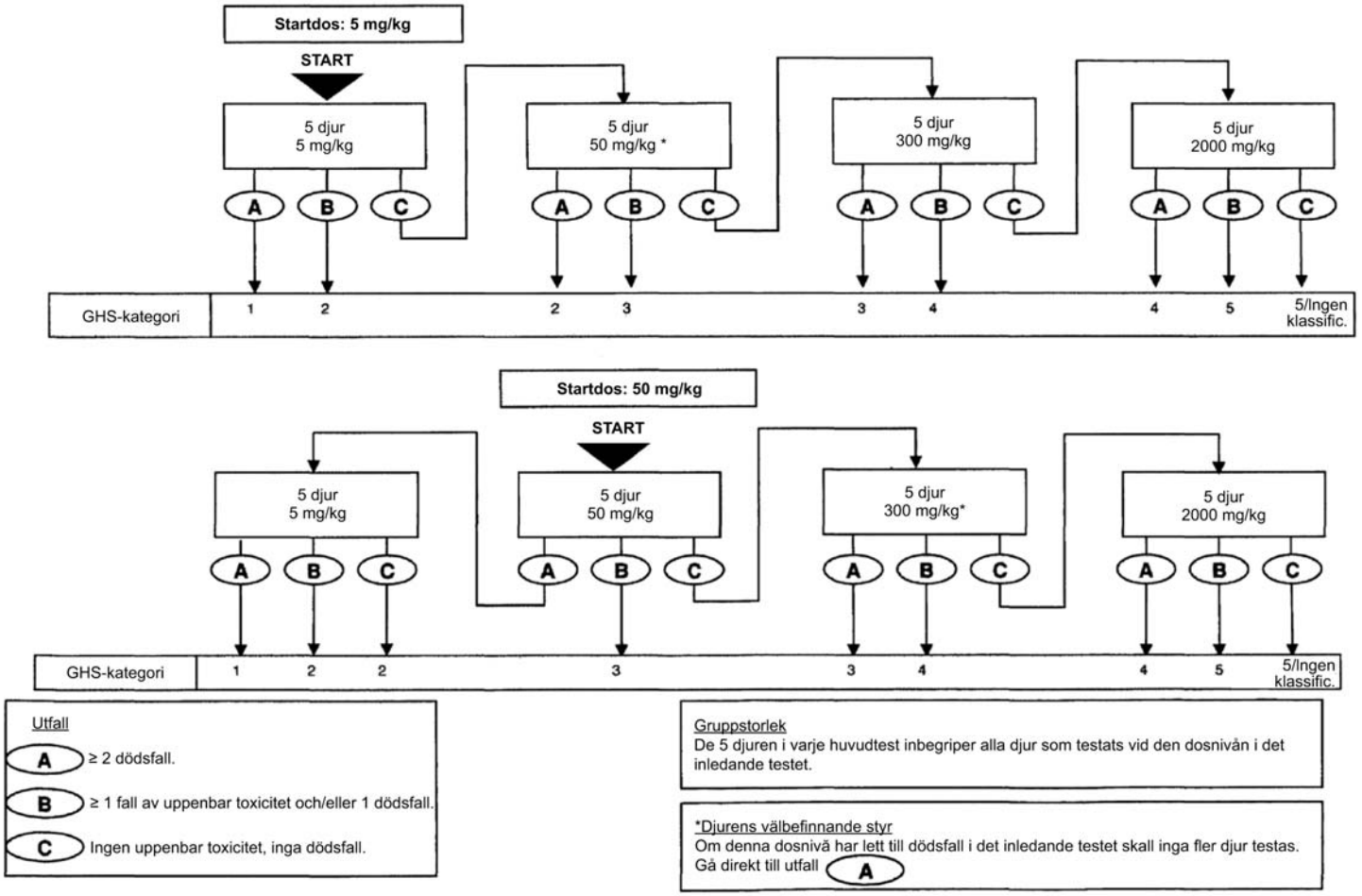
▼B


Startdos: 300 mg/kg
START
1 djur
5 mg/kg
1 djur
50 mg/kg
1 djur
300 mg/kg
1 djur
2000 mg/kg
A
B
C
GHS-kategori
1*
Startdos för
huvudtest (mg/kg):
5
5
50
50
300
300
2000
2000
Startdos: 2000 mg/kg
START
1 djur
5 mg/kg
1 djur
50 mg/kg
1 djur
300 mg/kg
1 djur
2000 mg/kg
GHS-kategori
1*
Startdos i huvudtest
(mg/kg):
5
5
50
50
300
300
2000
2000
Utfall
A
Död
B
Uppenbar toxicitet.
C
Ingen uppenbar toxicitet, ingen död.
* Vid utfall vid A 5 mg/kg kan ett valbart tilläggsförfarande användas för bekräftelse av GHS-klassificeringen (se avsnitt 1.5.2).

▼B

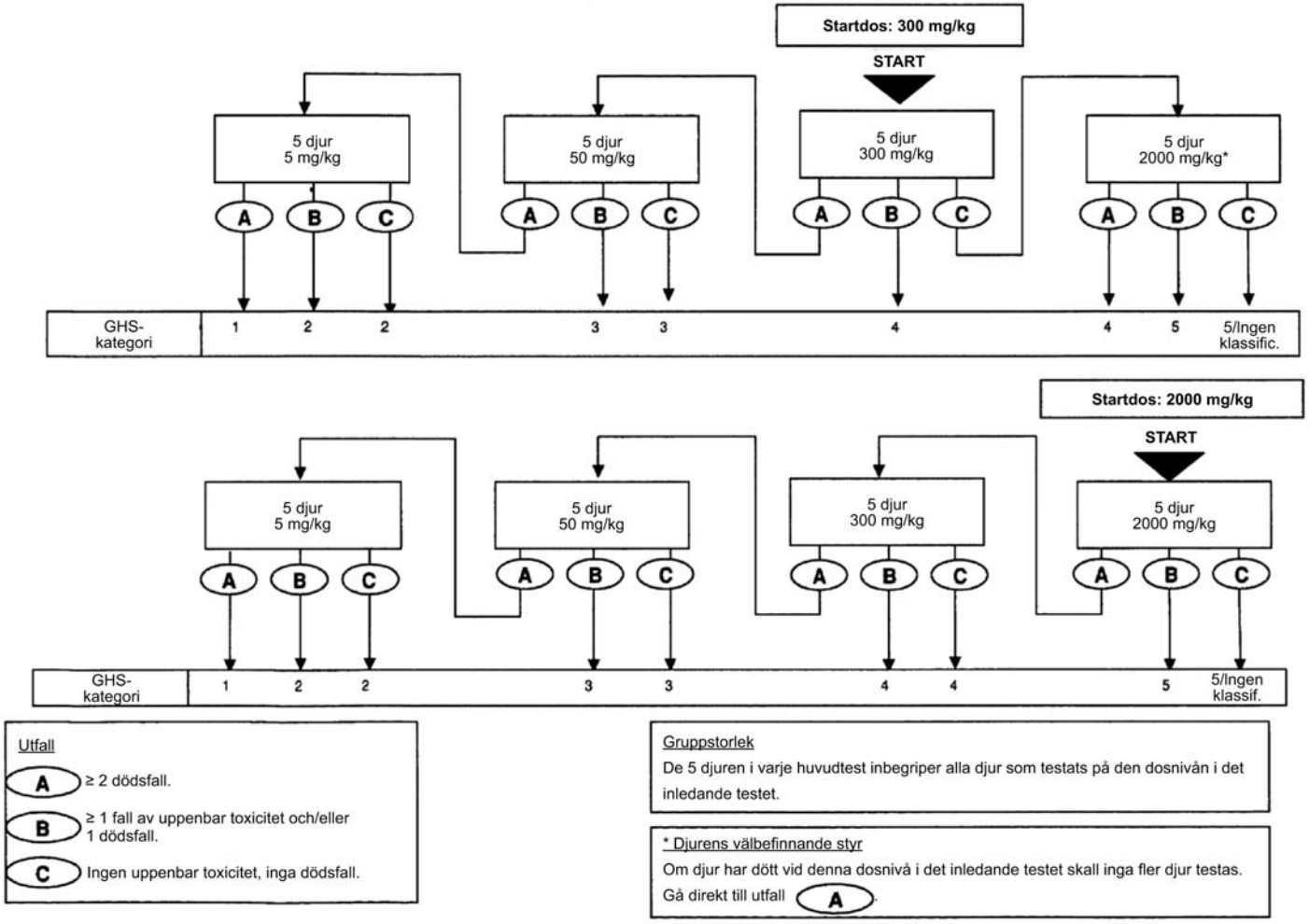
Bilaga 2

FLÖDESSCHEMA FÖR HUVUDTEST



02008R0440 — SV — 18.05.2017 — 007.001 — 210

▼B


Startdos: 300 mg/kg
START
5 djur
5 mg/kg
5 djur
50 mg/kg
5 djur
300 mg/kg
5 djur
2000 mg/kg*
A
B
C
GHS-
kategori
1
2
2
3
3
4
4
5
5/Ingen
klassific.
Startdos: 2000 mg/kg
START
5 djur
5 mg/kg
5 djur
50 mg/kg
5 djur
300 mg/kg
5 djur
2000 mg/kg
GHS-
kategori
1
2
2
3
3
4
4
5
5/Ingen
klassif.
Utfall
A ≥ 2 dödsfall.
B ≥ 1 fall av uppenbar toxicitet och/eller 1 dödsfall.
C Ingen uppenbar toxicitet, inga dödsfall.
Gruppstorlek
De 5 djuren i varje huvudtest inbegriper alla djur som testats på den dosnivån i det inledande testet.
* Djurens välbefinnande styr
Om djur har dött vid denna dosnivå i det inledande testet skall inga fler djur testas.
Gå direkt till utfall A.

▼B

Bilaga 3

KRITERIER FÖR HUR TESTÄMNEN MED FÖRVÄNTADE LD_{50}-VÄRDEN ÖVER 2 000 MG/KG KAN KLASSIFICERAS UTAN TESTNING

Med hjälp av kriterierna för riskkategori 5 kan man identifiera testämnen som har en relativt låg risk för akut toxicitet men som under vissa omständigheter kan utgöra en risk för sårbara populationer. Dessa ämnen förväntas ha ett LD_{50}-värde (oralt eller via huden) inom området 2 000–5 000 mg/kg eller motsvarande doser i fråga om andra tillförselvägar. Ett testämne kan klassificeras enligt riskkategorin 2 000 mg/kg < LD_{50} < 5 000 mg/kg (GHS-kategori 5) i följande fall:

a) Om ämnet hänförs till denna kategori enligt utfallet i något av de testningsscheman som finns i bilaga 2, på grundval av mortalitet.

b) Om det redan finns tillförlitliga bevis för att LD_{50}-värdet ligger inom det intervall som motsvarar kategori 5 eller om tidigare djurförsök eller toxiska verkningar hos människor tyder på akut fara för människors hälsa.

c) På grundval av extrapolering, uppskattning eller mätning av data, om det inte är motiverat att placera ämnet i en högre riskklass.

— Om det finns tillförlitlig information som tyder på betydande toxiska verkningar hos människor, eller något av följande:

— Mortalitet kan observeras vid testning med värden upp till kategori 4.

— En bedömning av sakkunniga bekräftar betydande kliniska tecken på toxicitet vid testning upp till värden för kategori 4, med undantag av diarré, upprest päls eller ovårdat utseende.

— En bedömning av sakkunniga bekräftar tillförlitlig information från andra djurförsök som tyder på förmågan till betydande akuta verkningar.

TESTNING PÅ DOSNIVÅER ÖVER 2 000 MG/KG

Undantagsvis, och endast när det kan motiveras med specifika tillsynskrav, får en ytterligare övre dosnivå på 5 000 mg/kg användas. Med hänsyn till djurens välbefinnande avråds testning på djur vid dosnivån 5 000 mg/kg. Sådan testning bör endast övervägas när det finns en stark sannolikhet för att resultaten har en direkt relevans för skyddet av djurs eller människors hälsa (9).

Inledande test

De beslutsregler som styr det sekventiella förfarandet enligt bilaga 1 utökas till att innefatta en dosnivå på 5 000 mg/kg. När en startdos på 5 000 mg/kg används vid ett inledande test och utfallet blir A (död) måste således ytterligare ett djur testas vid nivån 2 000 mg/kg, medan utfallen B och C (uppenbar toxicitet eller ingen toxicitet) gör det möjligt att använda 5 000 mg/kg som startdos i huvudtestet. På samma sätt gäller att om en startdos annan än 5 000 mg/kg används i ett test där man går vidare till 5 000 mg/kg efter att ha fått utfall B eller C vid nivån 2 000 mg/kg, leder ett utfall A på nivån 5 000 mg/kg till att huvudtestets startnivå blir 2 000 mg/kg medan utfallen B och C leder till 5 000 mg/kg som startnivå.

▼B

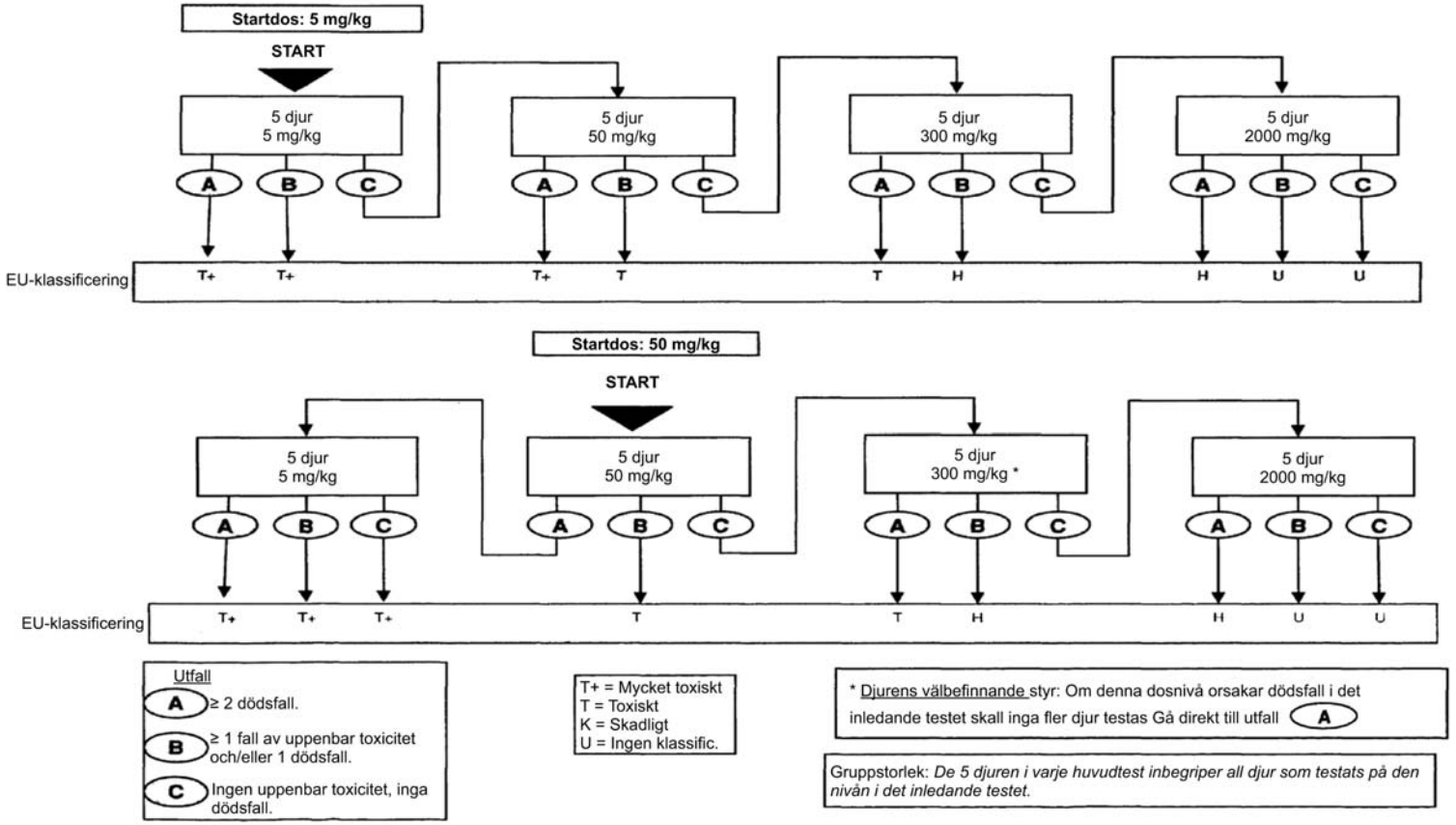
Huvudtest

De beslutsregler som styr det sekventiella förfarandet enligt bilaga 2 utökas till att innefatta en dosnivå på 5 000 mg/kg. Detta innebär att utfallet A (≥ 2 dödsfall) i ett huvudtest med startdosen 5 000 mg/kg leder till att en ytterligare grupp måste testas vid nivån 2 000 mg/kg, medan utfallet B (uppenbar toxicitet och/eller ≤ 1 dödsfall) eller C (ingen toxicitet) leder till att ämnet inte får någon klassificering enligt GHS. På liknande sätt gäller att om en startdos annan än 5 000 mg/kg används i ett test och man har gått vidare till dosnivån 5 000 mg/kg efter att ha fått utfall C vid dosnivån 2 000 mg/kg, leder utfallet A vid dosnivån 5 000 mg/kg till att ämnet anses tillhöra GHS-kategorin 5 medan utfall B eller C leder till att ämnet inte får någon klassificering.

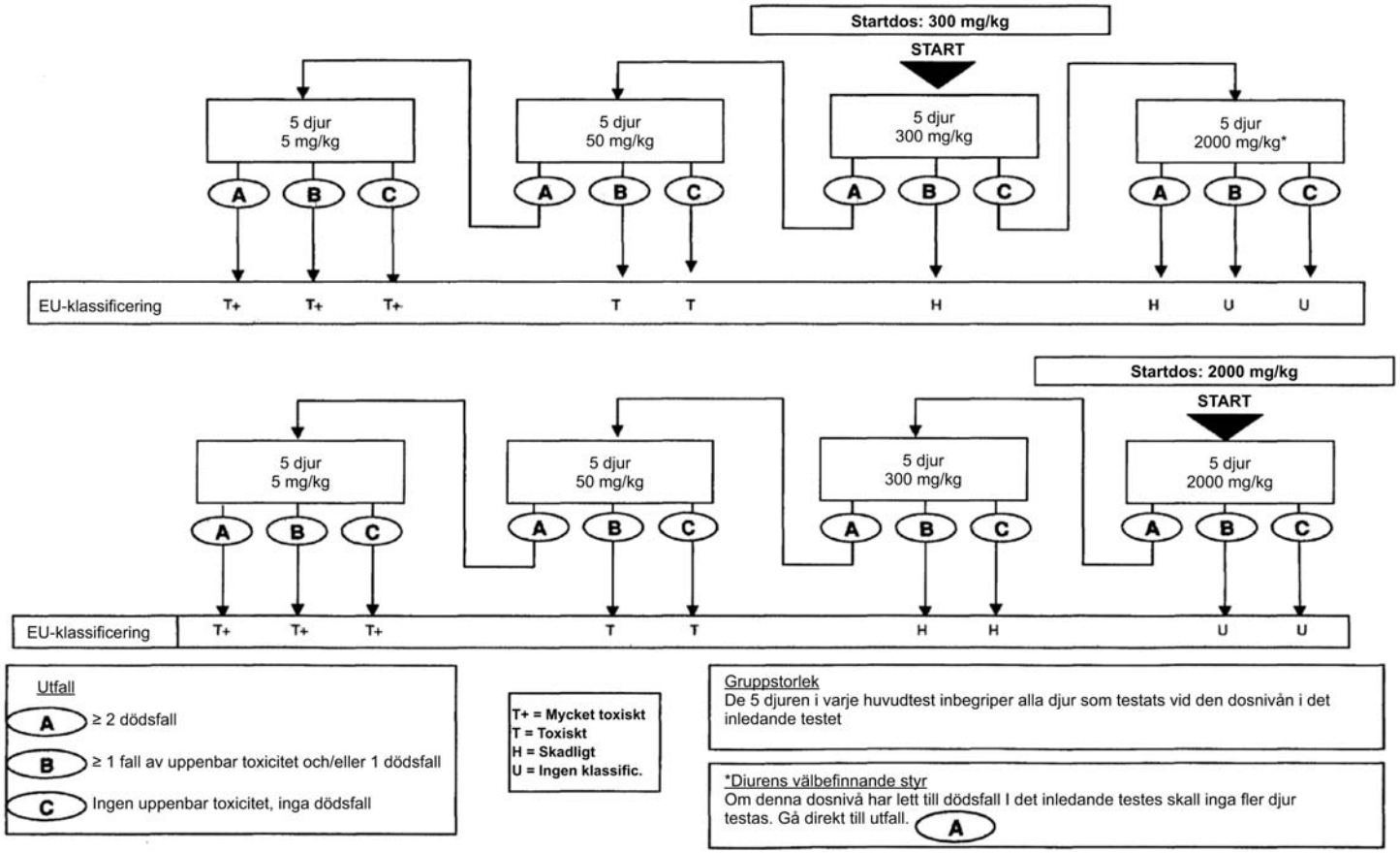
Bilaga 4

TESTMETOD B.l b

– Vägledning för klassificering enligt EU-Systemet, som gäller under övergångsperioden tills det globala harmoniserade systemet (GHS) för kassificering har genomförts helt (ur hänvisning 8)



▼B


Startdos: 300 mg/kg
START
5 djur
5 mg/kg
5 djur
50 mg/kg
5 djur
300 mg/kg
5 djur
2000 mg/kg*
A
B
C
EU-klassificering
T+
T+
T+
T
T
H
H
U
U
Startdos: 2000 mg/kg
START
5 djur
5 mg/kg
5 djur
50 mg/kg
5 djur
300 mg/kg
5 djur
2000 mg/kg
EU-klassificering
T+
T+
T+
T
T
H
H
U
U
Utfall
A ≥ 2 dödsfall
B ≥ 1 fall av uppenbar toxicitet och/eller 1 dödsfall
C Ingen uppenbar toxicitet, inga dödsfall
T+ = Mycket toxiskt
T = Toxiskt
H = Skadligt
U = Ingen klassific.
Gruppstorlek
De 5 djuren i varje huvudtest inbegriper alla djur som testats vid den dosnivån i det inledande testet
*Diurens välbefinnande styr
Om denna dosnivå har lett till dödsfall I det inledande testes skall inga fler djur testas. Gå direkt till utfall. A

▼B

B.1b AKUT TOXICITET ORALT – METOD FÖR BESTÄMNING AV AKUT TOXICITETSKLASS

1. METOD

Denna testmetod motsvarar OECD TG 423 (2001).

1.1 INLEDNING

Denna metod för bestämning av akut toxicitetsklass (se hänvisning 1) är ett stegvis förfarande där tre djur av samma kön används per steg. Beroende på mortaliteten och/eller förekomsten av döende djur behövs det i genomsnitt 2–4 steg för bedömningen av testämnets akuta toxicitet. Förfarandet är reproducerbart, kräver mycket få djur och ger en möjlighet att klassificera ämnen på ett liknande sätt som med de övriga metoderna för testning av akut toxicitet. Metoden för bestämning av akut toxicitetsklass baserar sig på biometriska bedömningar (se hänvisningarna 2, 3, 4 och 5) och fast definierade doser på tillräckligt separerade nivåer för att testämnet ska kunna kategoriseras för klassificering och riskbedömning. Metoden antogs 1996 och har validerats omfattande *in vivo* mot LD_{50}-data som erhållits vid litteraturstudier, både nationellt (se hänvisning 6) och internationellt (se hänvisning 7).

Riktlinjer för valet av den lämpligaste testmetoden för ett bestämt ändamål finns i vägledningen för testning av akut oral toxicitet (se hänvisning 8). I vägledningsdokumentet finns även tilläggsinformation rörande utförandet av testmetod B.1b och tolkningen av resultaten.

Testämnesdoser som, på grund av frätande eller allvarligt irriterande verkningar, är kända att orsaka klar smärta och svårt lidande behöver inte ges. Döende djur eller djur som uppvisar klara tecken på smärta eller allvarligt och ihållande lidande ska avlivas skonsamt, och vid tolkningen av testresultaten ska dessa djur beaktas på samma sätt som djur som har dött under testets gång. Kriterierna för beslut rörande avlivning av döende eller svårt lidande djur, liksom även vägledning om igenkänning av förutsägbar eller annalkande död, behandlas i en separat vägledning (se hänvisning 9).

Metoden bygger på användning av fast definierade doser, och resultatet ger en möjlighet att kategorisera och klassificera ett ämne enligt det globala harmoniserade systemet (GHS) för klassificering och märkning av kemikalier som orsakar akut toxicitet (se hänvisning 10).

Även om metoden i princip inte är avsedd att användas för beräkning av exakta LD_{50}-värden ger den ändå en möjlighet att bestämma exponeringsområden där ämnets verkan sannolikt är dödlig, eftersom den viktigaste ändpunkten för detta test fortfarande är andelen djur som dör. Bestämning av ett LD_{50}-värde med denna metod kan endast göras när minst två doser leder till en mortalitet som är högre än 0 % och lägre än 100 %. Eftersom testningen alltid utförs med fast definierade doser, oavsett vilket ämne som testas, och klassificeringen uttryckligen är bunden till antalet djur som reagerar på ett visst sätt, ökas möjligheterna till enhetliga testrapporter och repeterbarhet mellan olika laboratorier.

▼B

Testningslaboratoriet bör analysera all tillgänglig information om testämnet innan själva testningen genomförs. Sådan information inbegriper ämnets identitet och kemiska struktur, fysikalkemiska egenskaper, resultaten från andra eventuella *in vivo*- eller *in* vitro-test avseende toxicitet, toxikologiska data om strukturellt närbesläktade ämnen och ämnets förutsedda användningsändamål. Denna information behövs för att avgöra huruvida testet är relevant för skyddet av människors hälsa, och utgör en hjälp vid valet av en optimal startdos.

1.2 DEFINITIONER

Akut toxicitet (oralt): De skadliga verkningar som uppträder efter oral tillförsel av en engångsdos av ett ämne eller upprepade doser som ges inom 24 timmar.

Fördröjd död: Det att ett djur inte dör eller är döende inom 48 timmar, men dör senare under den 14 dagar långa observationsperioden.

Dos: Den mängd testämne som tillförs. Dosen uttrycks som vikten testämne per viktenhet försöksdjur (exempelvis mg/kg).

GHS: Globala harmoniserade systemet för klassificering och märkning av kemikalier och blandningar. Systemet utarbetas gemensamt inom OECD (människors hälsa och miljö), FN:s expertkommitté om transport av farligt gods (fysikalkemiska egenskaper) och ILO (varningar). Samordningen sker genom det gemensamma programmet för sund kemikaliehantering (IOMC).

Annalkande död: När ett djur troligen är döende eller har dött före den nästa planenliga observationstidpunkten. Tecken som tyder på detta tillstånd kan hos gnagare inbegripa konvulsioner, kroppsställning på sidan, bakåtlutad kroppsställning och tremor (närmare uppgifter finns i vägledningen om konsekvenser för människor, se hänvisning 9).

LD_{50} (median letal dos, oralt): En statistiskt fastställd engångsdos som troligen leder till döden för 50 % av de djur som har tillförts dosen oralt. LD_{50}-värdet uttrycks som vikten testämne per viktenhet försöksdjur (mg/kg).

Gränsdos: En testdos vid den övre gränsnivån (2 000 eller 5 000 mg/kg).

Döende djur: Ett djur som håller på att dö eller som har små chanser att överleva, även om det får behandling (närmare uppgifter finns i vägledningen om konsekvenser för människor, se hänvisning 9).

Förutsägbar död: Förekomsten av kliniska tecken som tyder på död vid en känd framtida tidpunkt som infaller före försökets planerade avslutningstidpunkt, exempelvis oförmåga att nå vatten eller föda (närmare uppgifter finns i vägledningen om konsekvenser för människor, se hänvisning 9).

▼B

1.3 PRINCIP FÖR TESTMETODEN

Testmetoden bygger på principen om att man genom ett stegvis förfarande med ett minimalt antal djur per steg kan få tillräcklig information om testämnets akuta toxicitet för att det ska vara möjligt att klassificera ämnet. Ämnet tillförs oralt till en grupp försöksdjur vid en av de definierade dosnivåerna. Ämnet testas genom ett stegvis förfarande med tre djur av samma kön (i regel honor) per steg. Avsaknaden eller förekomsten av ämnesrelaterad mortalitet hos de djur som doserats på ett visst steg avgör vilket av följande som blir nästa steg:

— Ingen ytterligare testning behövs.

— Ytterligare tre djur tillförs en lika stor dos.

— Ytterligare tre djur tillförs en dos på nästa högre eller lägre dosnivå.

Testningsförfarandet beskrivs närmare i bilaga 1. När denna metod används kan testämnet genom de olika utfallen placeras i en av de toxicitetsklasser som definieras genom fasta LD_{50}-gränsvärden.

1.4 BESKRIVNING AV TESTMETODEN

1.4.1 **Val av djurart**

Rekommenderad gnagare är råtta, även om testet kan utföras med andra gnagare. I regel används hondjur (se hänvisning 9). Skälet till detta är att litteraturundersökningar av konventionella LD_{50}-test tyder på att känslighetsskillnaderna mellan könen är små, men att honorna i förekommande fall ofta är en aning mer känsliga (se hänvisning 11). Om däremot kunskaperna om strukturellt närbesläktade ämnens toxikologiska eller toxikokinetiska egenskaper tyder på att hanarna sannolikt är känsligare än honorna bör hanar användas. Om testet görs på hanar bör tillbörlig motivering ges.

Djuren bör vara unga och friska vuxna exemplar som härrör från normala laboratoriestammar. Hondjuren får inte ha fött ungar och får inte vara dräktiga. När dostillförseln inleds ska djuret vara mellan 8 och 12 veckor gammalt, och variationerna i vikt får vara högst ± 20 % av medelvikten för alla tidigare djur som har doserats.

1.4.2 **Förvarings- och utfodringsbetingelser**

Temperaturen i testdjurens utrymmen bör vara 22 °C (± 3 °C). Den relativa fuktigheten bör vara minst 30 % och ska helst inte överstiga 70 %, utom när rummet rengörs. Målvärdet bör dock vara 50–60 %. Belysningen bör vara artificiell med omväxlande 12 timmar ljus och 12 timmar mörker. För utfodringen kan konventionellt laboratoriefoder användas, och djuren bör ha obegränsad tillgång till dricksvatten. Djur som tillförs doser på samma nivå kan inhysas i samma bur, men antalet djur per bur får inte vara högre än att klara observationer kan göras av varje djur.

▼B

1.4.3 **Förberedelse av djuren**

Djuren väljs ut slumpmässigt och förses med märkning så att de kan identifieras individuellt Därefter får djuren acklimatisera sig till laboratoriets betingelser i sina burar i minst 5 dagar före doseringsstart.

1.4.4 **Förberedelse av doserna**

I regel ska de olika doserna av testämnet tillföras i en konstant volym, vilket innebär att doserna har varierande koncentration. När slutprodukter i vätskeform eller blandningar testas, kan det med tanke på riskbedömningen vara mer relevant att använda testämnet i outspädd form (konstant koncentration), vilket även förutsätts av vissa tillsynsmyndigheter. Den maximala dosvolymen för tillförsel får aldrig överskridas. Den största mängd vätska som kan tillföras vid ett och samma tillfälle beror på testdjurets storlek. För gnagare bör denna volym i regel inte överskrida 1 ml per 100 g kroppsvikt. I fråga om vattenlösningar får dock 2 ml per 100 g kroppsvikt användas. För tillförsel av dosen rekommenderas alltid i första hand lösning, suspension eller emulsion i vatten, sedan lösning, suspension eller emulsion i olja (exempelvis majsolja) och därefter eventuella andra vehiklar. I fråga om andra vehiklar än vatten måste de toxikologiska egenskaperna vara kända. Doserna måste beredas strax före tillförseln, om inte preparatets stabilitet är känd och har påvisats vara godtagbar över hela användningsperioden.

1.5 FÖRFARANDE

1.5.1 **Tillförsel av doser**

Testämnet tillförs som en engångsdos genom sondmatning med hjälp av magsond eller lämplig intubationskanyl. I det sällsynta fall det inte är möjligt med en engångsdos, kan dosen tillföras i mindre delar över en period som inte överskrider 24 timmar.

Före dostillförseln hålls djuren fastande (utan föda och med tillgång till vatten, för råttor över natten och för möss i 3–4 timmar). Efter fasteperioden vägs djuren och testämnet tillförs. Efter tillförsel av ämnet kan djuren hållas utan föda i ytterligare 3–4 timmar (råttor) respektive 1–2 timmar (möss). Om dosen tillförs i delar över en tidsperiod kan det vara nödvändigt att ge djuren föda och vatten, beroende på tidsperiodens längd.

1.5.2 **Antalet djur och dosnivåer**

Tre djur används per steg. För startdosen väljs en av fyra fast definierade nivåer (5, 50, 300 eller 2 000 mg per kg kroppsvikt). För startdosen väljs den nivå som högst sannolikt leder till att ett antal av de doserade djuren dör. I flödesschemat i bilaga 1 beskrivs de förfaranden som gäller för de olika startdoserna. Dessutom innehåller bilaga 4 vägledning om klassificeringen enligt EU-systemet, som gäller tills det att det nya GHS-systemet har genomförts.

▼B

Om den tillgängliga informationen tyder på att inga djur dör vid den högsta startdosnivån (2 000 mg per kg kroppsvikt) bör ett gränstest utföras. Om det inte finns någon information tillgänglig om testämnet, rekommenderas med hänsyn till djurens välbefinnande att startdosen 300 mg per kg kroppsvikt används.

Tidsintervallet mellan dostillförseln till de olika grupperna bestäms av start, varaktighet och allvarlighets-grad för de toxiska tecknen. Doseringen av djuren på nästa dosnivå bör inte inledas förrän det råder säkerhet om de tidigare doserade djurens överlevnad.

Undantagsvis, och endast när det kan motiveras med specifika tillsynskrav, får en ytterligare övre dosnivå på 5 000 mg per kg kroppsvikt användas (se bilaga 2). Med hänsyn till djurens välbefinnande avråds testning på djur när det gäller GHS-kategori 5 (2 000–5 000 mg per kg kroppsvikt). Sådan testning bör endast övervägas när det finns en stark sannolikhet för att resultaten har direkt relevans för skyddet av människors eller djurs hälsa eller av miljön.

1.5.3 **Gränstest**

Gränstest används primärt i situationer där laboratoriet har information som tyder på att testämnet sannolikt inte är toxiskt (toxiskt endast ovanför de gränsdoser som anges i gällande föreskrifter). Information om testämnets toxicitet kan härledas från kunskaperna om liknande testade ämnen eller liknande testade blandningar eller produkter, med hänsyn tagen till identiteten och halten av de komponenter som har känd toxikologisk signifikans. Om informationen om ämnets toxicitet är bristfällig eller saknas, eller om ämnet troligen är toxiskt, bör huvudtestet genomföras.

Ett gränstest vid en dosnivå 2 000 mg per kg kroppsvikt kan utföras med sex djur (tre djur per steg). Undantagsvis kan ett gränstest på dosnivån 5 000 mg per kg kroppsvikt utföras med tre djur (se bilaga 2). Om testämnet orsakar dödsfall måste eventuellt ytterligare testning utföras på närmaste lägre nivå.

1.6 OBSERVATIONER

Efter doseringen observeras djuren individuellt minst en gång under de första 30 minuterna, periodiskt under de första 24 timmarna (med särskild uppmärksamhet under de första 4 timmarna) och därefter dagligen under totalt 14 dagar. Detta gäller inte för djur som av hänsyn till djurens välbefinnande måste avlivas skonsamt eller för djur som hittas döda. Observationsperiodens längd bör dock ha en anpassningsmån. Längden bör bestämmas enligt de toxiska reaktionerna, tidpunkten för när de sätter in och återhämtningsperiodens längd. Observationsperioden kan således förlängas om det anses vara nödvändigt. Tidpunkten då tecken på toxicitet uppträder och försvinner är viktig, särskilt om de toxiska tecknen tenderar att vara fördröjda (se hänvisning 12). Alla observationer registreras systematiskt, med individuella registreringar för varje djur.

▼B

Tilläggsobservationer behövs om djuren fortsätter att uppvisa tecken på toxicitet. Observationerna bör omfatta förändringar i hud och päls, ögon och slemhinnor samt även andningsorganen, cirkulationsorganen och det autonoma och centrala nervsystemet. Likaså bör den somatomotoriska aktiviteten och beteendemönstret observeras. Uppmärksamhet bör fästas vid observationer av tremor, konvulsioner, salivutsöndring, diarré, letargi, sömn och koma. Hänsyn bör tas till de principer och kriterier som anges i vägledningen om konsekvenser för människor (se hänvisning 8). Djur som befinns vara döende och djur som visar tecken på svår smärta eller ihållande lidande bör avlivas skonsamt. I fall där djur avlivas av hänsyn till djurens välbefinnande eller hittas döda, bör tidpunkten för dödsfallet registreras så exakt som möjligt.

1.6.1 **Kroppsvikt**

Djurens vikt bör registreras individuellt strax före testämnet tillförs och därefter minst en gång per vecka. Alla viktändringar bör bestämmas och registreras. Vid testets slut vägs alla överlevande djur och avlivas därefter skonsamt.

1.6.2 **Patologi**

Alla försöksdjur (inbegripet de som dött under testet eller som har avlivats av hänsyn till djurens välbefinnande) bör obduceras. Alla betydande patologiska förändringar bör registreras för varje djur. Användbar information kan även fås genom mikroskopundersökning av organ som uppvisar betydande skador och som härrör från djur som överlevt minst 24 timmar efter tillförsel av startdosen.

2. **DATA**

Data bör rapporteras individuellt per djur. Dessutom bör alla data sammanställas i tabellform. Tabellen ska för varje testgrupp visa antalet djur som använts, antalet djur som uppvisat tecken på toxicitet, antalet djur som under testets gång har dött eller avlivats av hänsyn till djurens välbefinnande, tidpunkterna för alla individuella dödsfall, en beskrivning av och förloppet för de toxiska verkningarna och deras reversibili-tet samt obduktionsfynd.

3. **RAPPORTERING**

3.1 **Testrapport**

Testrapporten ska innehålla nedan angivna uppgifter, enligt det som är relevant:

Testämne:

— Fysikalisk natur, renhet och, där det är relevant, fysikalkemiska egenskaper (inbegripet isomerisering).

— Identifieringsdata, inbegripet CAS-nummer.

Vehikel (i förekommande fall).

— Motivering för val av vehikel, om annan än vatten.

Försöksdjur:

— Art och stam som använts.

▼B

— Mikrobiologiska data för djuren, om dessa data är kända.

— Antalet djur, deras ålder och kön (och i förekommande fall en motivering för användning av hanar i stället för honor).

— Ursprung, förvaringsförhållanden, foder och dylikt.

Testbetingelser:

— Detaljerade uppgifter om testämnets sammansättning, inbegripet uppgifter om den tillförda dosens fysikaliska form.

— Uppgifter om hur testämnet har tillförts, inbegripet dosens volym och doseringstidpunkten.

— Detaljerade uppgifter om foder- och vattenkvalitet (inbegripet diettyp/källa, vattenkälla).

— Motivering för valet av startdos.

Resultat:

— En tabell med responsdata och dosnivå för varje djur (djur som uppvisat tecken på toxicitet samt mortalitet, verkningarnas natur, allvarlighetsgrad och varaktighet).

— Tabell med kroppsvikt och förändringar av kroppsvikt.

— Djurens individuella vikt på doseringsdagen och därefter med en veckas intervall, samt tidpunkten för dödsfall eller avlivning.

— Datum och tidpunkt för dödsfall som inträffat före den planenliga avlivningen.

— Tidsförloppet för när tecken på toxicitet sätter in och huruvida dessa är reversibla, för varje djur.

— Obduktionsfynd och histopatologiska fynd för varje djur, i förekommande fall.

Diskussion och tolkning av resultaten.

Slutsatser.

4. **HÄNVISNINGAR**

1. Roll R., Höfer-Bosse T. and Kayser D. (1986), New Perspectives in Acute Toxicity Testing of Chemicals. Toxicol. Lett., Suppl. 31, 86.

2. Roll R., Riebschläger M., Mischke U. and Kayser D. (1989), Neue Wege zur Bestimmung der akuten Toxizität von 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-Toxic- 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), Harmonized Integrated Hazard Classification System For Human Health And Environ mental 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., 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.

12. Chan P.K. and Hayes A.W. (1994), Chap. 16. Acute Toxicity and Eye Irritancy. *Principles and Methods ofToxicology.* Third Edition. A.W. Hayes, Editor. Raven Press, Ltd., New York, USA.

▼B

Bilaga 1

FÖRFARANDEN SOM BÖR FÖLJAS BEROENDE PÅ STARTDOS

ALLMÄNNA ANMÄRKNINGAR

För de olika startdoserna finns det olika testningsscheman som bör följas, enligt beskrivningen i denna bilaga.

— Bilaga 1 a: Startdosen är 5 mg per kg kroppsvikt.

— Bilaga 1 b: Startdosen är 50 mg per kg kroppsvikt.

— Bilaga 1 c: Startdosen är 300 mg per kg kroppsvikt.

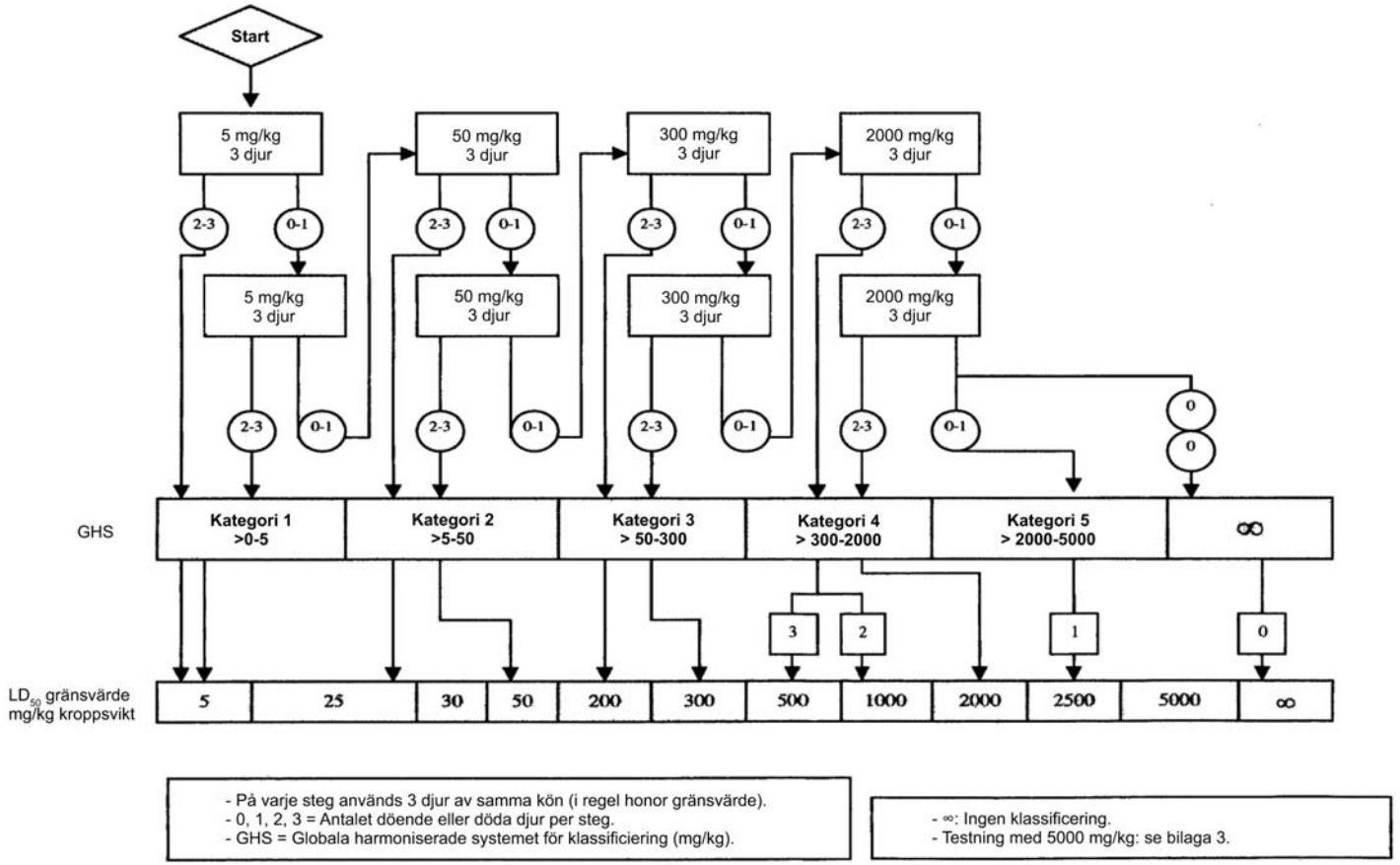
— Bilaga 1 d: Startdosen är 2 000 mg per kg kroppsvikt.

Testningens förlopp anges av pilarna och beror på antalet avlivade djur eller djur som dött.

▼B

Bilaga 1 A

TESTFÖRFARANDE MED STARTDOSEN 5 MG PER KG KROPPSVIKT

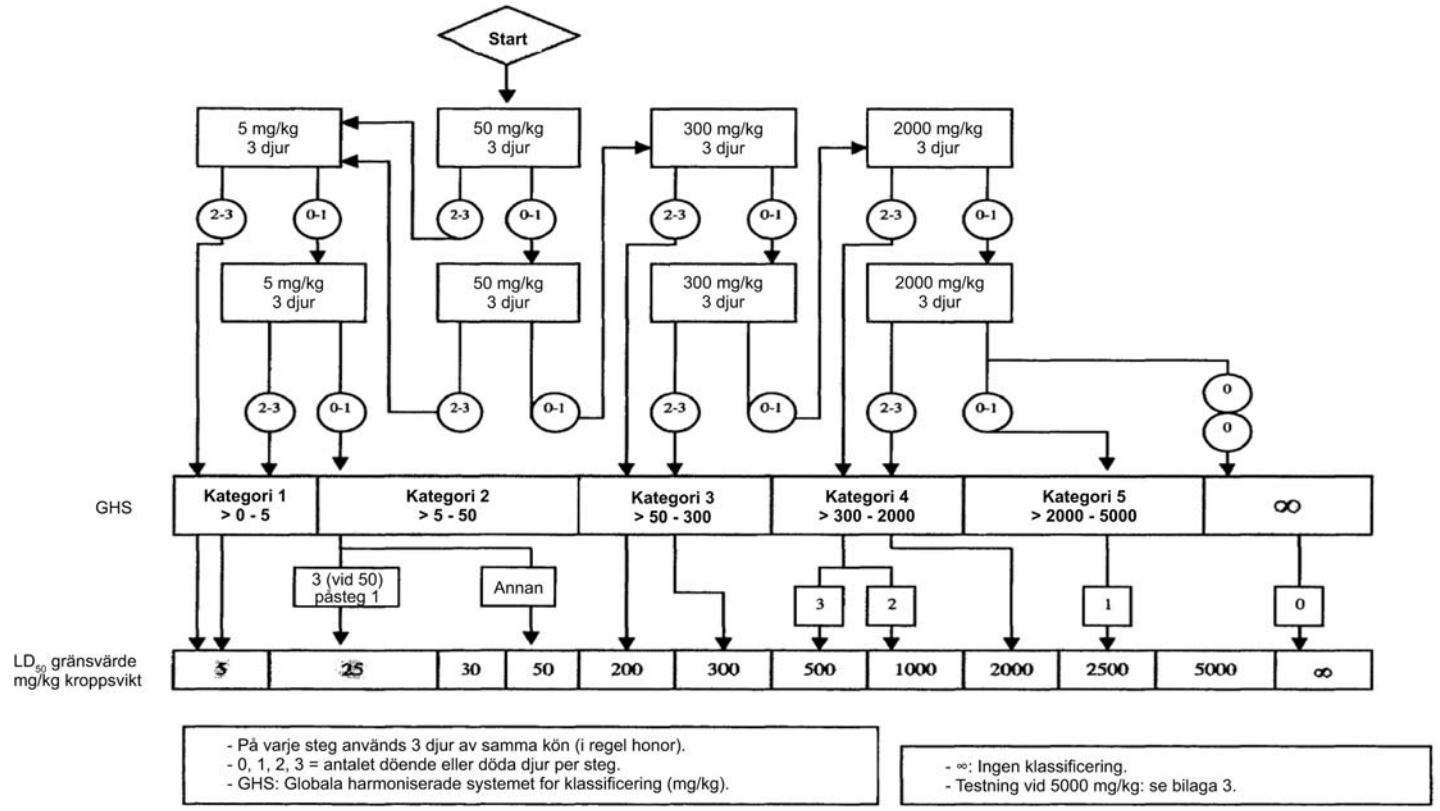


02008R0440 — SV — 18.05.2017 — 007.001 — 225

▼B

Bilaga 1 B

TESTFÖRFARANDE MED STARTDOSEN 50 MG PER KG KROPPSVIKT

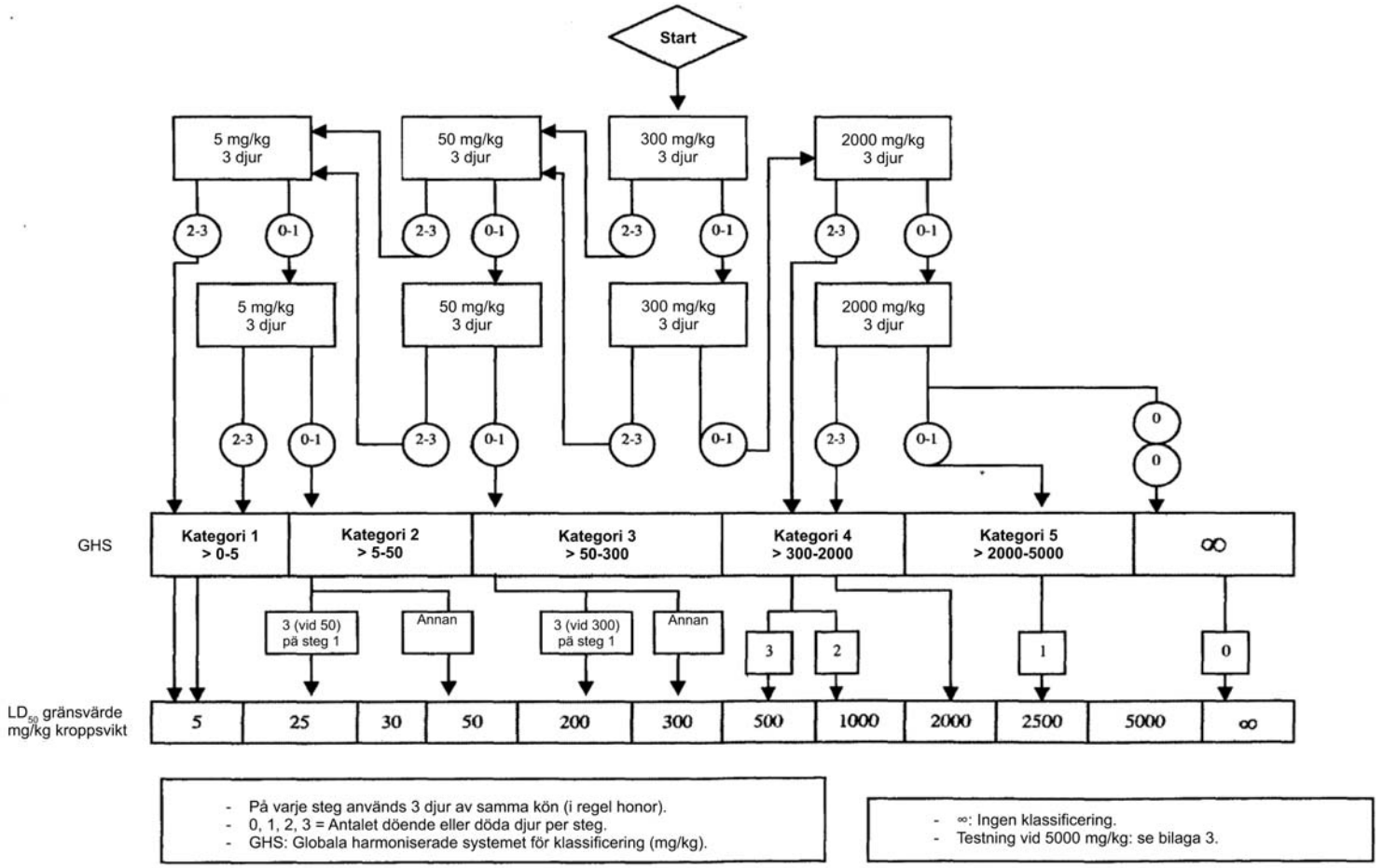


02008R0440 — SV — 18.05.2017 — 007.001 — 226

▼B

Bilaga 1 C

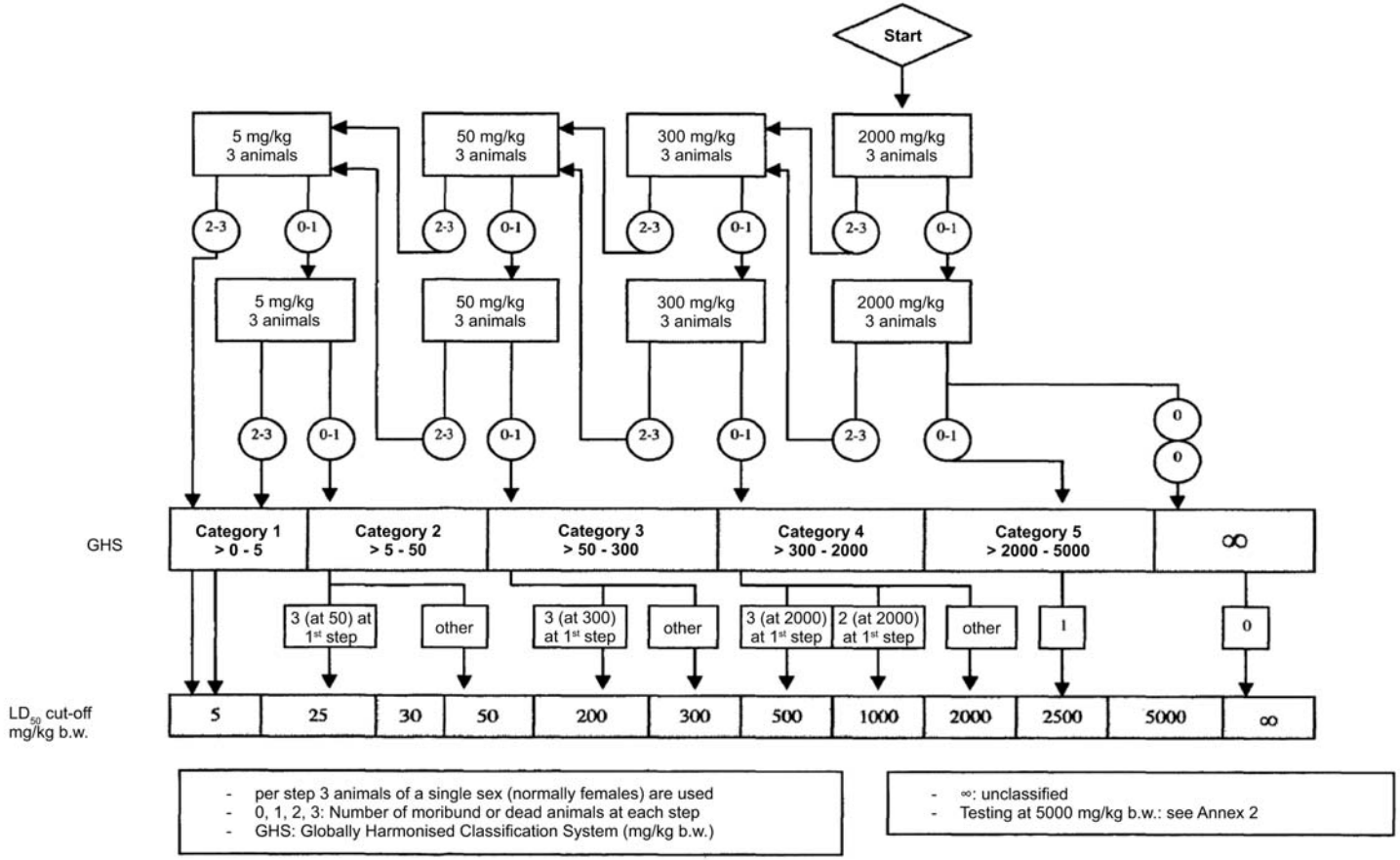
TESTFÖRFARANDE MED STARTDOSEN 300 MG PER KG KROPPSVIKT



▼B

Bilaga 1 D

TESTFÖRFARANDE MED STARTDOSEN 2 000 MG PER KG KROPPSVIKT



▼B

Bilaga 2

KRITERIER FÖR HUR TESTÄMNEN MED FÖRVÄNTADE LD_{50}-VÄRDEN ÖVER 2 000 MG/KG KAN KLASSIFICERAS UTAN TESTNING

Med hjälp av kriterierna för riskkategori 5 kan man identifiera testämnen som har en relativt låg risk för akut toxicitet men som under vissa omständigheter kan utgöra en risk för sårbara populationer. Dessa ämnen förväntas ha ett LD_{50}-värde (oralt eller via huden) inom området 2 000–5 000 mg/kg eller motsvarande doser i fråga om andra tillförselvägar. Ett testämne kan klassificeras enligt riskkategorin 2 000 mg/kg < LD_{50} < 5 000 mg/kg (GHS-kategori 5) i följande fall:

a) Om ämnet hänförs till denna kategori enligt utfallet i något av de testningsscheman som finns i bilaga 1A–1 D, på grundval av mortalitet.

b) Om det redan finns tillförlitliga bevis för att LD_{50}-värdet ligger inom det intervall som motsvarar kategori 5 eller om tidigare djurförsök eller toxiska verkningar hos människor tyder på akut fara för människors hälsa.

c) På grundval av extrapolering, uppskattning eller mätning av data, om det inte är motiverat att placera ämnet i en högre riskklass.

— Om det finns tillförlitlig information som tyder på betydande toxiska verkningar hos människor, eller något av följande:

— Mortalitet kan observeras vid testning med värden upp till kategori 4 via oral tillförsel.

— Om en bedömning av sakkunniga bekräftar signifikanta kliniska tecken på toxicitet vid testning med värden upp till kategori 4, med undantag av diarré, upprest päls eller ett ovårdat utseende.

— Om en bedömning av sakkunniga bekräftar tillförlitlig information från andra djurförsök som tyder på förmåga till signifikanta akuta verkningar.

TESTNING PÅ DOSNIVÅER ÖVER 2 000 MG/KG

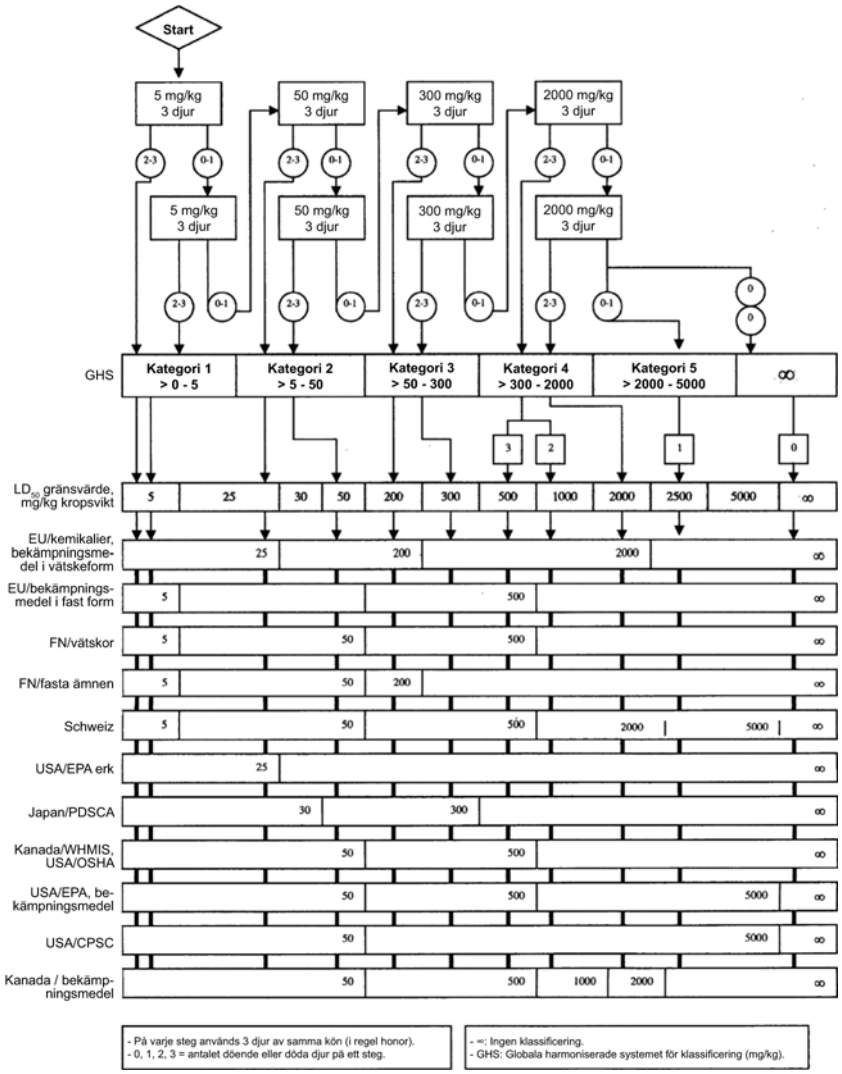
Med hänsyn till djurens välbefinnande avråds testning på djur när det gäller kategori 5 (5 000 mg/kg). Sådan testning bör endast övervägas när det finns en hög sannolikhet för att resultaten har direkt relevans för skyddet av djurens eller människors hälsa (se hänvisning 10). Ingen ytterligare testning bör utföras vid högre dosnivåer.

I nödvändiga fall används en dos på 5 000 mg/kg i ett enda steg (tre djur). Om det först doserade djuret dör, fortsätts doseringen till 2 000 mg/kg i enlighet med flödesschemat i bilaga 1. Om det första djuret överlever, doseras ytterligare två djur. Om endast ett av de tre djuren dör antas LD_{50}-värdet överskrida 5 000 mg/kg. Om de två djuren dör fortsätts doseringen med 2 000 mg/kg.

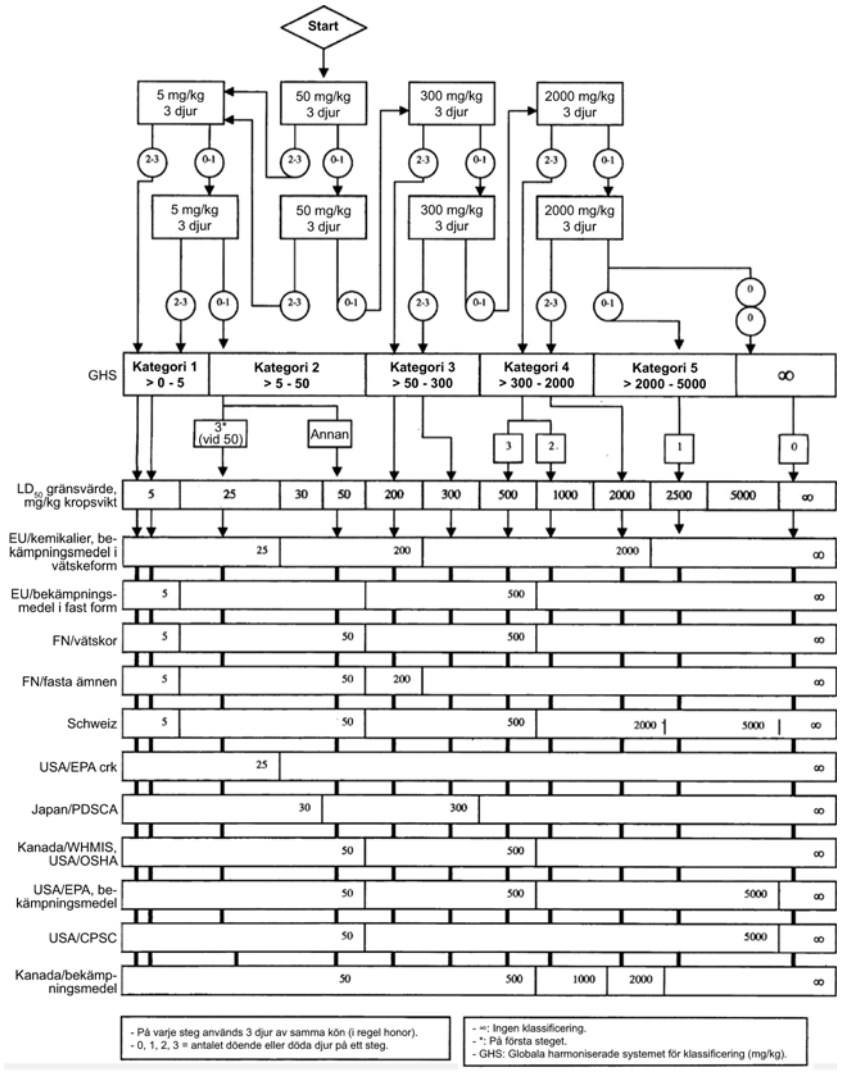
▼B

Bilaga 3

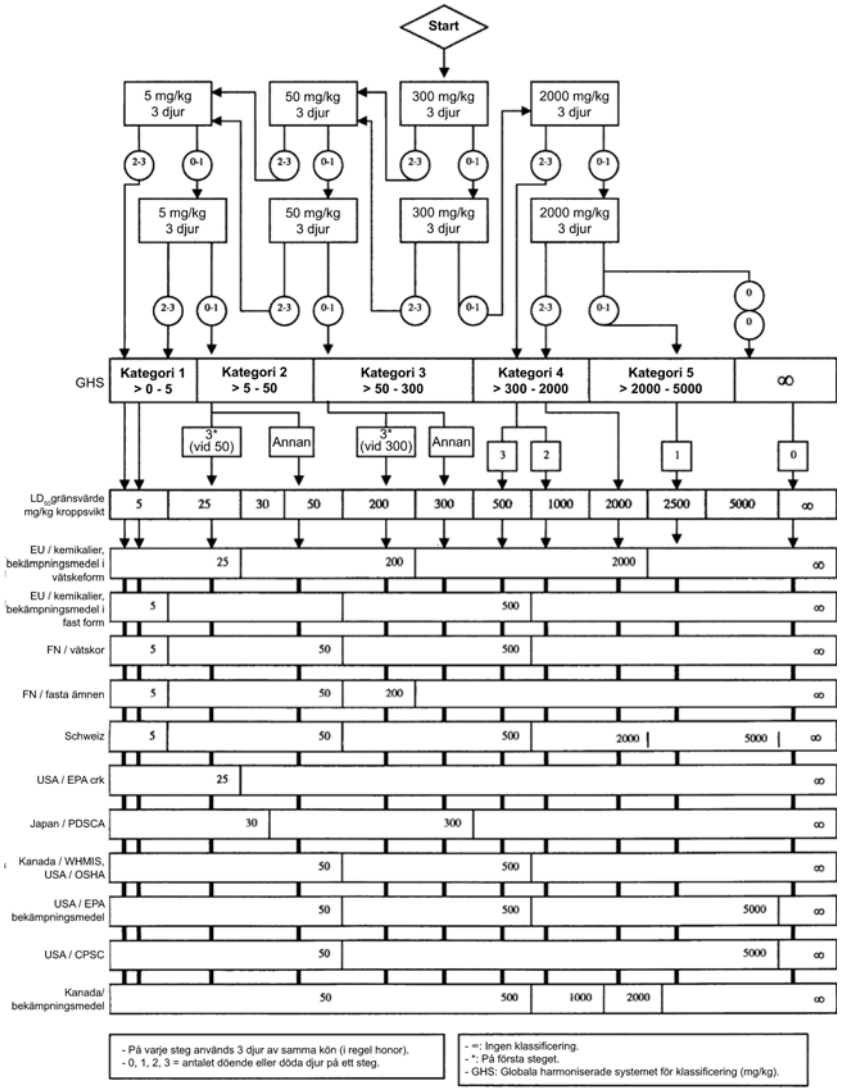
TESTMETOD B.1b: Vägledning för klassificering enligt EU-systemet, som gäller tills det globala harmoniserade systemet för klassificering och märkning av kemikalier (GHS) har genomförts helt (ur hänvisning 8)



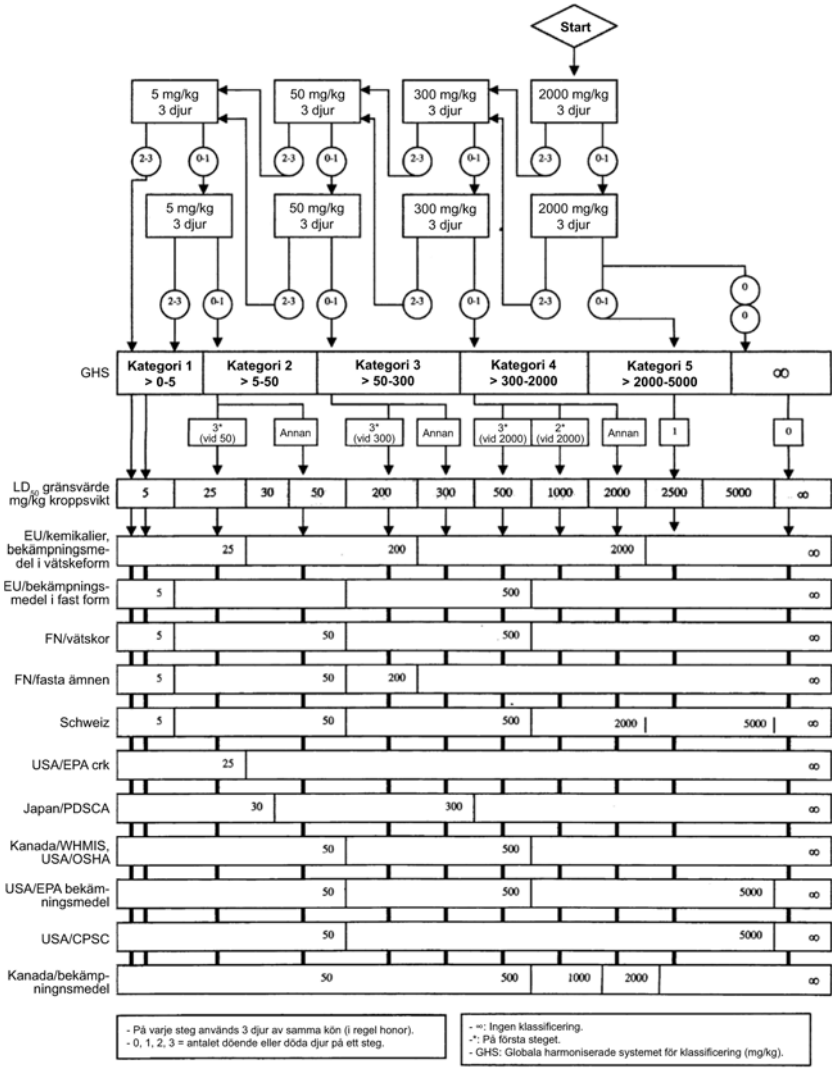
▼B


Start
5 mg/kg 3 djur
50 mg/kg 3 djur
300 mg/kg 3 djur
2000 mg/kg 3 djur
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* (vid 50)
Annan
LD50 gränsvärde, mg/kg kropsvikt
EU/kemikalier, bekämpningsmedel i vätskeform
EU/bekämpningsmedel i fast form
FN/vätskor
FN/fasta ämnen
Schweiz
USA/EPA crk
Japan/PDSCA
Kanada/WHMIS, USA/OSHA
USA/EPA, bekämpningsmedel
USA/CPSC
Kanada/bekämpningsmedel
- På varje steg används 3 djur av samma kön (i regel honor).
- 0, 1, 2, 3 = antalet döende eller döda djur på ett steg.
- ∞: Ingen klassificering.
- *: På första steget.
- GHS: Globala harmoniserade systemet för klassificering (mg/kg).

▼B


Start
5 mg/kg 3 djur
50 mg/kg 3 djur
300 mg/kg 3 djur
2000 mg/kg 3 djur
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* (vid 50)
Annan
3* (vid 300)
3
2
1
LD50-gränsvärde mg/kg kroppsvikt
5 25 30 50 200 300 500 1000 2000 2500 5000 ∞
EU / kemikalier, bekämpningsmedel i vätskeform
25 200 2000 ∞
EU / kemikalier, bekämpningsmedel i fast form
5 500 ∞
FN / vätskor
5 50 500 ∞
FN / fasta ämnen
5 50 200 ∞
Schweiz
5 50 500 2000 5000 ∞
USA / EPA crk
25 ∞
Japan / PDSCA
30 300 ∞
Kanada / WHMIS, USA / OSHA
50 500 ∞
USA / EPA bekämpningsmedel
50 500 5000 ∞
USA / CPSC
50 5000 ∞
Kanada/ bekämpningsmedel
50 500 1000 2000 ∞
- På varje steg används 3 djur av samma kön (i regel honor).
- 0, 1, 2, 3 = antalet döende eller döda djur på ett steg.
- ∞: Ingen klassificering.
- *: På första steget.
- GHS: Globala harmoniserade systemet för klassificering (mg/kg).

▼B


Start
5 mg/kg 3 djur
50 mg/kg 3 djur
300 mg/kg 3 djur
2000 mg/kg 3 djur
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* (vid 50)
Annan
3* (vid 300)
3* (vid 2000)
2* (vid 2000)
1
LD50 gränsvärde mg/kg kroppsvikt
5 25 30 50 200 300 500 1000 2000 2500 5000 ∞
EU/kemikalier, bekämpningsmedel i vätskeform
EU/bekämpningsmedel i fast form
FN/vätskor
FN/fasta ämnen
Schweiz
USA/EPA crk
Japan/PDSCA
Kanada/WHMIS, USA/OSHA
USA/EPA bekämningsmedel
USA/CPSC
Kanada/bekämpningsmedel
- På varje steg används 3 djur av samma kön (i regel honor).
- 0, 1, 2, 3 = antalet döende eller döda djur på ett steg.
- ∞: Ingen klassificering.
-*: På första steget.
- GHS: Globala harmoniserade systemet för klassificering (mg/kg).

▼M4

B.2 AKUT INHALATIONSTOXICITET

INLEDNING

1. Den här testmetoden motsvarar OECD:s testriktlinje 403 (2009) (1). Den ursprungliga testriktlinjen för akut inhalation 403 (TG 403) antogs 1981. Denna reviderade testmetod B.2 (som motsvarar den reviderade TG 403) har utformats för att vara mer flexibel, för att minska användningen av djur, och för att uppfylla regulatoriska behov. Den reviderade testmetoden presenterar två studietyper: Ett traditionellt LC_{50}-protokoll och ett koncentration × tid-protokoll (k × t). Den här testmetodens visar primärt förhållandet mellan koncentration-respons vars räckvidd sträcker sig från icke-dödlig till dödlig utgång så att man kan komma fram till en genomsnittlig dödlig koncentration (LC_{50}), icke-dödlig tröskelkoncentration (t.ex. LC01), och kurva, och för att identifiera en möjlig könsberoende mottaglighet. K × t-protokollet ska användas om det finns ett specifikt rättsligt eller vetenskapligt behov som kräver testning av djur som sträcker sig över flera tidsperioder, såsom katastrofhanteringsplanering (värden för att t.ex. komma fram till riktnivåer för akut exponering (AEGL), riktlinjer för katastrofhanteringsplanering (ERPG) eller tröskelvärden för akut exponering (AETL)), eller markanvändningsplanering.

2. I vägledningsdokumentet om akut inhalationstoxicitet (GD 39) (2) kan man få vägledning om den här beskrivna metodens genomförande och tolkning vid studier.

3. Definitioner som används inom ramen för den här metoden finns i slutet av det här kapitlet och i GD 39 (2).

4. Den här testmetoden möjliggör karakterisering och kvantitativ riskbedömning av testkemikalierna och gör det möjligt att rangordna och klassificera testkemikalierna i enlighet med förordning (EG) nr 1272/2008 (3). GD 39 (2) ger en vägledning om valet av en lämplig testmetod vid akuttestning. Om endast information om klassificering och märkning krävs, rekommenderas rent allmänt kapitel B.52 i denna bilaga (4) (se GD 39 (2)). Den här testmetoden B.2 är inte specifikt avsedd för testning av specialmaterial såsom svårlösliga isometriska eller fibrösa material, eller avsiktligt tillverkade nanomaterial.

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN

5. Innan man överväger ett test i enlighet med den här testmetoden bör testlaboratoriet överväga all information avseende testkemikalien, inklusive befintliga studier (t.ex. kapitel B.52 i denna bilaga (4)) vars data visar att man inte behöver göra fler tester för att därmed minska djuranvändningen. Information som kan underlätta val av lämplig art, stam, kön, exponeringssätt och lämplig testkoncentration är ämnets identitet och kemiska struktur, fysikalisk-kemiska egenskaper, resultat från andra eventuella in vitro- eller in vivo-tester avseende toxicitet; förväntad användning och risken för mänsklig exponering, tillgängliga (Q)SAR-data samt toxikologiska data om strukturellt närbesläktade ämnen (se GD 39 (2)).

▼M4

6. Testning av frätande och/eller irriterande kemikalier vid koncentrationer som förväntas orsaka svår smärta och/eller lidande bör undvikas så vitt det är möjligt. Eventuell frätning/irritation bör utvärderas genom en sakkunnig bedömning som grundas på erfarenheter från människa och djur (t.ex. genom upprepade doseringsstudier utförda med doser som inte är frätande/irriterande), befintliga in vitro-data (t.ex. från kapitel B.40, (5), B.40a (6) i denna bilaga eller OECD TG 435 (7)), pH-värden, information om liknande ämnen eller eventuellt andra relevanta data i syfte att undersöka om man kan undvika ytterligare testning. För specifika regulatoriska behov (t.ex. i beredskapsplaneringssyften), kan den här testmetoden användas för att exponera djur för dessa ämnen, eftersom det ger försöksledaren eller den ansvarige prövaren kontroll över valet av målkoncentrationer. I vilket fall som helst ska målkoncentrationer inte medföra allvarlig irritation/frätning, men ändå vara tillräckliga för att utvidga koncentrations-responskurvan till nivåer som gör att testets regulatoriska och vetenskapliga mål kan uppfyllas. Dessa koncentrationer ska väljas från fall till fall och det ska finnas en motivering för valet av koncentration (se GD 39 (2)).

PRINCIP FÖR TESTMETODEN

7. Den här reviderade testmetoden B.2 har utformats för att man ska erhålla tillräcklig information om en testkemikalies akuta toxicitet för att klassificera den och tillhandahålla dödlighetsdata (t.ex. $LC_{50,}$ LC_{01} och lutning) för ett eller båda könen efter behov för kvantitativ riskbedömning. Den här testmetoden erbjuder två metoder. Den första metoden är ett traditionellt protokoll i vilka grupper av djur exponeras för en begränsad koncentration (toleranstest) eller en serie koncentrationer i ett stegvist förfarande under en förutbestämd period på normalt 4 timmar. Andra exponeringstider kan gälla för specifika regulatoriska ändamål. Den andra metoden är ett ($k \times t$) protokoll i vilka grupper av djur exponeras för en (gränskoncentration) eller en serie av koncentrationer som sträcker sig över flera perioder.

8. Döende djur eller djur som visar tecken på uppenbar smärta eller svårt och ihållande lidande ska avlivas skonsamt och medtas i tolkningen av testresultaten på samma sätt som de som avled under testet. Kriterier för att ta beslutet att avliva döende eller svårt lidande djur, och vägledning om hur man känner igen tecknen på förutsägbar eller annalkande död, omfattas i OECD:s vägledningsdokument nr 19 om humana endpoints (8).

METODBESKRIVNING

Val av djurart

9. I testet används friska unga vuxna djur av stammar som vanligtvis används på laboratorier. För detta test används råtta och det ska motiveras om annan art används.

Förberedelse av djuren

10. Honorna ska inte ha fått ungar och inte vara dräktiga. På exponeringsdagen bör djuren vara unga vuxna 8 till 12 veckor gamla och kroppsvikten bör ligga inom ± 20 % av medelvikten för vardera könet av eventuella tidigare exponerade djur i samma ålder. Djuren väljs ut slumpmässigt och förses med märkning så att de kan identifieras individuellt. Därefter får djuren acklimatisera sig till laboratoriets betingelser i sina burar i minst fem dagar före teststarten. Djuren bör också acklimatisera sig till testutrustningen en kort period före testet, eftersom detta minskar den stress som en ny miljö innebär.

▼M4

Djurhållning

11. Temperaturen i försöksdjurens utrymmen bör vara 22 ± 3 °C. Den relativa fuktigheten bör ligga mellan 30 och 70 %, även om detta kanske inte är möjligt när vatten används som vehikel. Före och efter exponeringen bör djuren inhysas i grupper avhängigt kön och koncentration, dock får antalet djur per bur inte hindra en tydlig observation av varje enskilt djur, och förluster genom kannibalism och slagsmål bör minimeras. Om endast djurens nosar ska exponeras kan det vara nödvändigt att de får acklimatisera sig till fasthållningsrören. Fasthållningsrören ska inte medföra onödig fysisk, termisk eller fasthållningsstress för djuren. Fasthållning kan påverka fysiologiska endpoints såsom kroppstemperatur (hypotermi) och/eller minimala respiratoriska volymer. Om det finns generiska data tillgängliga som inte pekar på sådana förändringar i någon nämnvärd omfattning är det inte nödvändigt med anpassningen till rören före exponeringen. Djur vars hela kroppar ska exponeras för en aerosol ska inhysas individuellt under exponeringen för att förhindra att de andra djuren i buren filtrerar aerosolen genom sina pälsar. För utfodringen kan konventionellt laboratoriefoder användas, utom under exponeringen, tillsammans med en obegränsad tillgång till vatten. Belysningen bör vara artificiell med omväxlande 12 timmar ljus och 12 timmar mörker.

Inhalationskammare

12. Vid val av inhalationskammare bör man beakta kemikaliens beskaffenhet och testets ändamål. Det föredragna exponeringssättet är enbart nos (termen inkluderar även enbart huvud, enbart nos eller enbart tryne). Exponering av enbart nos föredras i allmänhet vid studier av vätskor och fasta aerosoler och ånga som kan kondenseras och bilda aerosoler. Vissa av undersökningens mål kan bättre uppnås genom exponering av hela kroppen, men detta ska motiveras i undersökningsrapporten. För att säkerställa atmosfärisk stabilitet vid användningen av en helkroppskammare ska den totala volymen av försöksdjuren inte överskrida 5 % av kammarens volym. Teknikerna för enbart nos och helkroppsexponeringen, deras principer och särskilda för- och nackdelar finns beskrivna i GD 39 (2).

EXPONERINGSBETINGELSER

Administration av koncentrationer

13. Enbart nos-exponering kan för råttor vara av vilken längd som helst upp till 6 timmar. Om möss exponeras enbart nos överskrider exponeringen i allmänhet inte 4 timmar. Motivering bör ges om längre tidsperioder för studier behövs (se GD 39 (2)). Djur som exponeras för aerosoler i helkroppskammare ska inhysas individuellt för att hindra intagandet av testkemikalien vid skötsel av de andra djuren i buren. Inget foder ska ges under exponeringsperioden. Vatten kan tillhandahållas under en helkroppsexponering.

14. Djur exponeras för testkemikalien som en gas, ånga, aerosol eller en blandning av dem. Det fysikaliska tillstånd som ska testas beror på testkemikaliens fysikalisk-kemiska egenskaper, vald koncentration och/eller dess mest sannolika fysikaliska form vid hanteringen och användningen. Hygroskopiska och kemiskt reaktiva testkemikalier ska testas i torr luft. Det är viktigt att se till att inga explosiva koncentrationer skapas.

▼M4

Partikelstorleksfördelning

15. Partikeldimensionering bör utföras för alla aerosoler och ångor som kan kondenseras och bilda aerosoler. För att möjliggöra exponering av alla relevanta områden i luftvägarna, rekommenderas aerosoler med en aerodynamisk diameter (MMAD) i intervallet 1 till 4 μm med en geometrisk standardavvikelse (σ_g) i intervallet 1,5 till 3,0 (2) (9) (10). Även om en rimlig ansträngning krävs för att uppfylla denna standard bör en sakkunnig bedömning göras om detta inte kan uppnås. Till exempel kan metalldimma understiga denna standard, och laddade partiklar, fibrer och hygroskopiska material (som ökar i storlek i den fuktiga miljön i andningsvägarna) kan överstiga denna standard.

Beredning av testkemikalie i en vehikel

16. En vehikel kan användas för att generera en lämplig koncentration och partikelstorlek av testkemikalien i atmosfären. I regel bör vatten ha företräde. För att uppnå den erfordrade partikelstorleksfördelningen bör partikelmaterialet utsättas för mekaniska processer, emellertid bör man iaktta försiktighet så att inte testkemikalien sönderdelas eller förändras. I de fall där mekaniska processer tros ha förändrat testkemikaliens sammansättning (t.ex. extrema temperaturer från friktionen vid överdriven fräsning), bör testkemikaliens sammansättning verifieras analytiskt. Det är viktigt att testkemikalien inte förorenas. Det är inte nödvändigt att testa icke-spröda granulära material som avsiktligt är sammansatta så att de inte kan inhaleras. Ett friktionstest ska användas för att visa att inga inandningsbara partiklar bildas när det granulära materialet hanteras. Om ett friktionstest bildar inandningsbara ämnen ska ett test utföras avseende inhalationstoxicitet.

Kontrolldjur

17. Det är inte nödvändigt med en parallell negativ (luft-) kontrollgrupp. Om en annan vehikel än vatten används för att skapa testatmosfären ska en vehikelkontrollgrupp endast användas när historiska data om inhalationstoxicitet inte är tillgängliga. Om en toxicitetsstudie av en testkemikalie som har beretts i en vehikel inte påvisar någon toxicitet, framgår det att vehikeln är icke-toxisk vid den testade koncentrationen, och därmed finns det inget behov av en vehikelkontroll.

ÖVERVAKNING AV EXPONERINGSFÖRHÅLLANDEN

Kammarens luftflöde

18. Luftflödet genom kammaren ska omsorgsfullt kontrolleras, kontinuerligt övervakas och registreras minst en gång i timmen under varje exponering. Övervakningen av testatmosfärens koncentration (eller stabilitet) är en integrerad mätning av samtliga dynamiska parametrar och ett indirekt sätt att kontrollera alla relevanta atmosfärsskapande dynamiska parametrar. Särskild hänsyn bör tas för att undvika återandning i enbart nos-kammare i de fall där luftflödet genom exponeringssystemet är otillräckligt för att ge ett dynamiskt flöde i testkemikalieatmosfären. Det finns föreskrivna metoder som kan användas för att visa att återandning inte sker under de valda processförhållandena (2) (11). Syrehalten bör vara minst 19 % och koncentrationen av koldioxid bör inte överstiga 1 %. Om det finns anledning att tro att dessa standarder inte kan uppfyllas bör man mäta koncentrationen av syre och koldioxid.

▼M4

Kammarens temperatur och relativa fuktighet

19. Kammarens temperatur bör upprätthållas vid 22 ± 3 °C. Relativ fuktighet i djurens andningsområden, gäller både enbart nos och helkroppsexponering, bör övervakas och registreras minst tre gånger under tidsperioder på upp till 4 timmar, och varje timme för kortare tidsperioder. Den relativa fuktigheten bör företrädesvis upprätthållas inom intervallet 30 till 70 %, men detta kanske inte är möjligt (t.ex. vid testning av vattenbaserade blandningar) eller inte mätbart på grund av att testkemikalien stör själva testmetoden.

Testkemikalie: Nominell koncentration

20. När det är möjligt bör den nominella koncentrationen i exponeringskammaren beräknas och registreras. Den nominella koncentrationen är massan av den genererade testkemikalien dividerad med den totala volymen av luft som passerade genom kammarsystemet. Den nominella koncentrationen används inte för att karakterisera djurens exponering, men en jämförelse mellan den nominella koncentrationen och den faktiska koncentrationen ger en indikation på testsystemets genereringsprestanda, och kan därmed användas för att upptäcka genereringsproblem.

Testkemikalie: Faktisk koncentration

21. Den faktiska koncentrationen är testkemikaliens koncentration i djurets andningsområde i en inhalationskammare. Faktiska koncentrationer kan erhållas genom särskilda metoder (t.ex. direkt provtagning, adsorptiva eller kemiskt reaktiva metoder, och efterföljande analytisk karakterisering) eller av ickespecifika metoder såsom gravimetrisk filteranalys. Användningen av gravimetrisk analys är endast acceptabel för pulveraerosoler bestående av en enda komponent eller aerosoler bestående av vätskor med låg flyktighet, och bör stödjas av en lämplig preklinisk studie med kemikaliespecifik karakterisering. Koncentrationen i pulveraerosoler bestående av flera komponenter kan också bestämmas genom gravimetrisk analys. Detta kräver dock analysresultat som visar att sammansättningen av luftburet material liknar startmaterialet. Om denna information inte finns tillgänglig kan det vara nödvändigt med en ny analys av testkemikalien (helst i sitt luftburna tillstånd) under loppet av studien. För medel i aerosolform som kan förångas eller sublimeras bör man kunna visa att samtliga faser uppsamlades med den valda metoden.

22. Målkoncentrationerna och de nominella och faktiska koncentrationerna ska finnas med i undersökningsrapporten, men endast de faktiska koncentrationerna används i de statistiska analyserna för att beräkna värdena för dödlig koncentration. En sats av testkemikalien ska användas, om möjligt, och provet ska lagras under sådana förhållanden att det bibehåller sin renhet, homogenitet och stabilitet. Inför starten av studien bör det finnas en beskrivning av testkemikalien som inbegriper dess renhet och, om det är tekniskt genomförbart, identitet, och kvantiteterna av identifierade föroreningar och orenheter. Detta kan visas genom, men är inte begränsat till, följande data: Retentionstid och relativ topparea, molekylvikt från masspektroskopi eller gaskromatografianalys, eller andra uppskattningar. Även om testlaboratoriet inte ansvarar för provets identitet kan det vara klokt att man i stora drag bekräftar karakteriseringen (t.ex. färg, fysisk natur etc.).

23. Exponeringsatmosfären ska hållas så konstant som möjligt och övervakas kontinuerligt och/eller intermittent beroende på analysmetoden. När intermittent provtagning används bör prover på kammaratmosfären tas minst två gånger under en fyratimmarsstudie. Om det inte är möjligt på grund av begränsade luftflöden eller låga koncentrationer, kan ett prov tas under hela exponeringsperioden. Om märkta prov-till-prov-fluktationer förekommer, bör man för de påföljande koncentrationerna som ska testas ta fyra

▼M4

prover per exponering. Provtagning av koncentrationer från individuella kammare bör inte avvika från den genomsnittliga koncentrationen med mer än ± 10 % för gaser och ångor eller ± 20 % för flytande eller fasta aerosoler. Tiden tills kammaren når jämvikt (t_{95}) bör beräknas och registreras. Varaktigheten för en exponering spänner sig över den tid som testkemikalien genereras och tar hänsyn till den tid som krävs för att uppnå t_{95}. Riktlinjer för att uppskatta t_{95} finns i GD 39 (2).

24. För mycket komplexa blandningar bestående av gaser/ångor och aerosoler (t.ex. förbränningsatmosfärer och testkemikalier framdrivna från därför avsedd slutanvändningsprodukt/-utrustning). Varje fas kan bete sig annorlunda i en inhalationskammare så minst en indikatorsubstans ska väljas (analyt), vanligtvis den huvudsakliga aktiva substansen i blandningen för varje fas (gas/ånga och aerosol). När testkemikalien är en blandning ska den analytiska koncentrationen i blandningen rapporteras, inte bara den aktiva substansen eller komponenten (analyten). Ytterligare information om faktisk koncentration finns i GD 39 (2).

Testkemikalie: Partikelstorleksfördelning

25. Aerosolers partikelstorleksfördelning bör fastställas minst två gånger under varje 4-timmarsexponering med hjälp av en kaskadimpaktor eller ett alternativt instrument såsom en aerodynamisk partikelsorterare. Om man kan visa ett likvärdigt resultat från en kaskadimpaktor eller det alternativa instrumentet, kan man använda det sistnämnda under hela försöket. En andra enhet, till exempel ett gravimetriskt filter eller en impinger/gasbubblare, bör användas parallellt med det primära instrumentet för att bekräfta uppsamlingsprestandan hos det primära instrumentet. Masskoncentrationen som erhållits genom analys av partikelstorleken ska ligga inom rimliga gränser för den masskoncentration som erhållits genom filteranalys (se GD 39 (2)). Om likvärdigheten kan påvisas i ett tidigt skede av försöket kan ytterligare bekräftande mätningar utelämnas. Av djurskyddsskäl bör åtgärder vidtas för att minimera ofullständiga uppgifter som kan leda till en upprepning av exponeringen. Partikeldimensionering bör utföras för ångorna, om det finns en möjlighet att kondensen kan bilda en aerosol, eller om partiklar upptäcks i ångatmosfären som kan göra så att faserna blandas (se punkt 15).

PROCEDUR

26. Två studietyper beskrivs nedan: det traditionella protokollet och k × t-protokollet. Båda protokollen kan inkludera en inledande studie, en huvudstudie och/eller ett toleranstest (traditionellt protokoll), eller testning av en gränskoncentration (k × t). Om det ena könet är känt för att vara mer mottagligt kan försöksledaren välja att utföra studierna med enbart det mottagliga könet. Om andra gnagare än råttor utsätts för enbart nos, kan de maximala exponeringstiderna justeras för att minska artspecifikt lidande. Innan försöket påbörjas ska alla tillgängliga data beaktas för att minimera djuranvändningen. Till exempel kan data som genereras genom användning av kapitel B.52 i denna bilaga (4) eliminera behovet av en inledande studie, och kan också visa om ett kön är mer mottagligt (se GD 39 (2)).

▼M4

TRADITIONELLT PROTOKOLL

Allmänna överväganden: Traditionellt protokoll

27. I en traditionell studie exponeras grupper av djur för testkemikalier under en fast tidsperiod (vanligtvis 4 timmar) i antingen en exponeringskammare för enbart nos eller en helkroppskammare. Djuren exponeras antingen för en begränsad koncentration (toleranstest) eller för minst tre koncentrationer i ett stegvist förfarande (huvudstudie). En inledande studie kan föregå en huvudstudie om det inte redan finns någon information om testkemikalien, såsom en tidigare utförd B.52-studie (se GD 39 (2)).

Inledande studie: Traditionellt protokoll

28. En inledande studie används för att uppskatta testkemikaliens potens, identifiera könsskillnader beträffande mottaglighet, och för att välja nivå på exponeringskoncentrationen för huvudstudien eller toleranstestet. När man väljer nivå på koncentrationen för den inledande studien ska alla tillgängliga data användas, inklusive tillgängliga (Q)SAR-data och data för liknande kemikalier. Inte fler än tre hanar och tre honor ska exponeras för varje koncentration (3 djur per kön kan behövas för att fastställa en könsskillnad). En inledande studie kan bestå av en engångskoncentration, men fler koncentrationer kan testas vid behov. En inledande studie ska inte testa så många djur och koncentrationer att det liknar en huvudstudie. En tidigare utförd B.52-studie (4) kan användas i stället för en inledande studie (se GD 39 (2)).

Toleranstest: Traditionellt protokoll

29. Ett toleranstest används när testkemikalien är känd eller förväntas vara praktiskt taget icke-toxisk, dvs. framkalla en toxisk reaktion endast över den regulatoriska gränskoncentrationen. I ett toleranstest exponeras en enda grupp bestående av tre hanar och tre honor för testkemikalien vid en koncentrationsgräns. Information om testkemikaliens toxicitet kan erhållas genom kunskap om liknande testade kemikalier, med beaktande av identitet och procentandel av komponenter kända för en signifikant toxicitet. I situationer när det finns lite eller ingen information om dess toxicitet, eller testkemikalien förväntas vara toxisk, ska huvudtestet utföras.

30. Valet av koncentrationsgräns är vanligtvis beroende av regulatoriska krav. När förordning (EG) nr 1272/2008 används, är respektive koncentrationsgräns för gaser, ångor och aerosoler 20 000 ppm, 20 mg/l och 5 mg/l (eller den maximalt uppnåeliga koncentrationen) (3). Det kan vara tekniskt utmanande att generera koncentrationsgränser för vissa kemikalier, särskilt ångor och aerosoler. När man testar aerosoler bör det primära målet vara att uppnå en andningsbar partikelstorlek (MMAD av 1–4 μm). Det är möjligt för de flesta kemikalier med en koncentration på 2 mg/l. Testning av aerosoler med högre än 2 mg/l ska endast göras om en andningsbar partikelstorlek kan uppnås (se GD 39 (2)). Förordning (EG) nr 1272/2008 avråder från testning över koncentrationsgränsen av djurskyddsskäl (3). Koncentrationsgränsen ska endast övervägas om ett sådant test har en direkt relevans för skyddet av människors hälsa (3), och motivering angiven i undersökningsrapporten. När det gäller potentiellt explosiva testkemikalier bör man vara noga med att undvika förhållanden som är gynnsamma för en explosion. För att undvika onödig användning av djur ska ett test genomföras utan djur före toleranstestet, för att se till att förhållandena i kammaren kan uppnås för ett toleranstest.

▼M4

31. Om mortalitet eller döende observeras vid koncentrationsgränsen kan resultaten från toleranstestet tjäna som ett inledande test för ytterligare tester vid andra koncentrationer (se huvudstudie). Om en testkemikalies fysikaliska eller kemiska egenskaper gör det omöjligt att nå koncentrationsgränsen ska den maximalt uppnåeliga koncentrationen testas. Om dödligheten är lägre än 50 % vid den maximalt uppnåeliga koncentrationen behöver inga fler tester utföras. Om koncentrationsgränsen inte kunde uppnås ska undersökningsrapporten ge en förklaring och understödjande data. Om den maximalt nåbara koncentrationen för en ånga inte framkallar toxicitet kan det bli nödvändigt att generera testkemikalien som en flytande aerosol.

Huvudstudie: Traditionellt protokoll

32. En huvudstudie utförs normalt med fem hanar och fem honor (eller 5 djur av det mottagliga könet, om detta är känt) per koncentrationsnivå, med minst tre koncentrationsnivåer. För att uppnå en gedigen statistisk analys ska tillräckliga koncentrationsnivåer användas. Tidsintervallet mellan exponeringsgrupperna fastställs genom start, varaktighet och allvarlighetsgrad för tecknen på toxicitet. Exponering av djur vid nästa koncentrationsnivå ska fördröjas tills det finns rimlig anledning att anta att tidigare testade djur överlever. Detta gör att försöksledaren kan justera målkoncentrationen för nästa exponeringsgrupp. På grund av att man behöver sofistikerad teknik är detta inte alltid praktiskt genomförbart i inhalationsstudier, därför bör djurens exponering baseras på tidigare erfarenheter och vetenskapliga bedömningar. Man bör konsultera GD 39 (2) vid testning av blandningar.

PROTOKOLL FÖR KONCENTRATION × TID (K × T)

Allmänna överväganden: k × t-protokoll

33. En stegvis k × t-studie kan övervägas som ett alternativ till ett traditionellt protokoll vid bedömning av inhalationstoxicitet (12) (13) (14). Detta tillvägagångssätt låter djuren exponeras för en testkemikalie på flera koncentrationsnivåer och med olika varaktigheter. Samtliga tester utförs i en enbart nos-kammare (helkroppskammare är inte praktiska för detta protokoll). Ett flödesdiagram i tillägg 1 belyser detta protokoll. En simuleringsanalys har visat att det traditionella protokollet och k × t-protokollet båda är kapabla att ge gedigna LC_{50}-värden, men k × t-protokollet är generellt bättre på att ge gedigna LC_{01}- och LC_{10}-värden (15).

34. En simuleringsanalys har visat att användningen av två djur per k × t-intervall (ett per kön vid användning av båda könen eller två av det mer mottagliga könet) i allmänhet kan vara tillräckligt när man testar 4 koncentrationer och 5 exponeringsvaraktigheter i en huvudstudie. Under vissa omständigheter kan försöksledaren välja att använda två råttor per kön per k × t-intervall (15). Att använda 2 djur per kön per koncentration och tidpunkt kan minska förutfattade meningar angående uppskattningarnas variation, öka framgångsgraden och förbättra konfidensintervallets täckning. I händelse av att resultatet inte ligger tillräckligt nära uppskattningsdatan (vid användning av ett djur per kön eller två av det mer mottagliga könet) kan dock även en 5:e koncentrationsexponering räcka. Ytterligare vägledning om antalet djur och koncentrationer som ska användas i en k × t-studie finns i GD 39 (2).

▼M4

Inledande studie: k × t-protokoll

35. En inledande studie används för att uppskatta testkemikaliens potens och underlätta valet av exponeringens koncentrationsnivåer för huvudstudien. En inledande studie som använder upp till tre djur per kön och koncentration (beträffande detaljer se tillägg III till GD 39 (2)) kan behöva välja en lämplig startkoncentration till huvudstudien för att minimera antalet djur som används. Det kan vara nödvändigt att använda tre djur per kön för att fastställa en könsskillnad. Dessa ska exponeras för en enstaka tidsperiod, vanligtvis 240 min. Möjligheten att generera adekvata testatmosfärer bör utvärderas vid tekniska förtester utan djur. Vanligtvis behöver man inte genomföra en inledande studie om det finns tillgängliga mortalitetsdata från en B.52-studie (4). När man väljer den inledande målkoncentrationen i en B.2-studie bör försöksledaren beakta mortalitetsmönstret som observerats i eventuella tillgängliga B.52-studier (4) för båda könen och för alla testade koncentrationer (se GD 39 (2)).

Inledande koncentration: k × t-protokoll

36. Den inledande koncentrationen (exponeringssession 1) (tillägg 1) är antingen en gränskoncentration eller en koncentration vald av försöksledaren baserad på den inledande studien. Grupper om 1 djur per kön exponeras för den här koncentrationen under flera tidsperioder (t.ex. 15, 30, 60, 120 eller 240 minuter) vilket resulterar i ett totalt antal av 10 djur (vilket kallas exponeringssession I) (tillägg 1).

37. Valet av koncentrationsgräns är vanligtvis beroende av regulatoriska krav. När förordning (EG) nr 1272/2008 används, är respektive koncentrationsgräns för gaser, ångor och aerosoler 20 000 ppm, 20 mg/l och 5 mg/l (eller den maximalt uppnåeliga koncentrationen) (3). Det kan vara tekniskt utmanande att generera koncentrationsgränser för vissa kemikalier, särskilt ångor och aerosoler. Vid testning av aerosoler bör målet vara att uppnå en inandningsbar partikelstorlek (dvs. en MMAD på 1–4 μm) vid en koncentrationsgräns på 2 mg/l. Detta är möjligt för de flesta testkemikalier. Testning av aerosoler med mer än 2 mg/l bör endast utföras om en andningsbar partikelstorlek kan uppnås (se GD 39 (2)). Förordning (EG) nr 1272/2008 avråder från testning över koncentrationsgränsen av djurskyddsskäl (3). Testning över koncentrationsgränsen ska endast övervägas när ett sådant test har en direkt relevans för skyddet av människors hälsa (3), motiveringen ska anges i undersökningsrapporten. När det gäller potentiellt explosiva testkemikalier bör man vara noga med att undvika förhållanden som är gynnsamma för en explosion. För att undvika onödig djuranvändning ska ett test genomföras utan djur före testningen med den inledande koncentrationen för att säkerställa att förhållandena i kammaren kan uppnås för denna koncentration.

38. Om mortalitet eller döende observeras vid den inledande koncentrationen kan resultaten från denna koncentration tjäna som en inledande studie för ytterligare tester vid andra koncentrationer (se huvudstudie). När en testkemikalies fysikaliska eller kemiska egenskaper gör det omöjligt att nå koncentrationsgränsen ska den maximalt uppnåeliga koncentrationen testas. Om dödligheten är lägre än 50 % vid den maximalt uppnåeliga koncentrationen behöver inga fler tester utföras. Om koncentrationsgränsen inte kunde uppnås ska undersökningsrapporten ge en förklaring och understödjande data. Om den maximalt nåbara koncentrationen för en ånga inte framkallar toxicitet kan det bli nödvändigt att generera testkemikalien som en flytande aerosol.

▼M4

Huvudstudie: k × t-protokoll

39. Den inledande koncentrationen (exponeringssession 1) (tillägg 1) som testas i huvudstudien är antingen en gränskoncentration eller en koncentration vald av försöksledaren baserad på den inledande studien. Om mortalitet har observerats under eller efter exponeringssession 1 kommer den minsta exponering (k × t) som leder till mortalitet att användas som riktlinje för fastställande av koncentration och exponeringsperiod för exponeringssession II. Varje efterföljande exponeringssession bygger på den föregående (se tillägg 1).

40. För många testkemikalier är det resultat som erhålls vid den initiala koncentrationen, tillsammans med ytterligare tre exponeringssessioner med ett mindre tidsrutsystem (dvs. det geometriska mellanrummet för exponeringsperioder som anges av faktorn mellan på varandra följande perioder, i allmänhet √2), tillräckligt för att fastslå k × t-dödlighetsförhållandet (15), men det kan finnas vissa fördelar med att använda en 5:e exponeringskoncentration (se tillägg 1 och GD 39 (2)). För matematisk behandling av resultaten från k × t-protokollet, se tillägg 1.

IAKTTAGELSER

41. Djuren bör ofta observeras kliniskt under exponeringsperioden. Efter exponeringen ska kliniska observationer göras minst två gånger på dagen för exponeringen, eller oftare om djurens respons på behandlingen indikerar det, och därefter minst en gång per dag under en period av 14 dagar. Observationstidens längd är inte fast, utan bör bestämmas utifrån art och tidpunkt för de första kliniska tecknen samt längden på återhämtningsperioden. De tillfällen då tecken på toxicitet uppträder och försvinner är viktig, särskilt om tecknen på toxicitet visar en tendens att fördröjas. Alla observationer registreras systematiskt med individuella registreringar för varje djur. Djur som påträffas döende och djur som visar tecken på uppenbar smärta och/eller svårt ihållande lidande ska avlivas skonsamt av djurskyddsskäl. Försiktighet bör iakttas vid utförande av undersökningar för kliniska tecken på toxicitet, så att djur som ser dåliga ut och har övergående respiratoriska förändringar till följd av exponeringsförfarandet, inte misstas för testkemikalierelaterad toxicitet som kräver förtida avlivande av djuren. Principerna och kriterierna som finns sammanfattade i vägledningsdokumentet om humana endpoints (GD 19) bör tas i beaktande (7). När djur avlivas av humanitära skäl eller påträffas döda, ska tidpunkten för dödsfallet registreras så noggrant som möjligt.

42. Observationer vid buren bör omfatta förändringar i bur och päls, ögon och slemhinnor, samt även andningsorganen, cirkulationsorganen och det autonoma och centrala nervsystemet, samt kroppsmotorik och beteendemönster. Om möjligt bör eventuella skillnader mellan lokala och systematiska effekter noteras. Uppmärksamhet bör fästas vid observationer av tremor, konvulsioner, salivutsöndring, diarré, letargi, sömn och koma. Mätningen av rektal temperatur kan ge belägg för bradypnéreflex eller hypo/hypertermi relaterat till behandling eller inspärrning.

Kroppsvikt

43. Vikten på individuella djur bör registreras en gång under acklimatiseringsperioden på exponeringsdagen före exponeringen (dag 0), och åtminstone dag 1, 3 och 7 (och därefter varje vecka), och vid tidpunkten då döden eller avlivningen inträffar om dag 1 överskrids. Kroppsvikt är en erkänt viktig indikator på toxicitet, så djur som uppvisar en fortsatt minskning på ≥ 20 % jämfört med värdena i förstudien bör noggrant övervakas. Djur som överlever vägs och avlivas skonsamt i slutet av perioden efter exponeringsperioden.

▼M4

Patologi

44. Alla försöksdjur, inklusive de som avlider under testet eller avlivas och tas bort från undersökningen av djurskyddsskäl bör obduceras. Om en obduktion inte kan utföras omedelbart efter att ett dött djur har upptäckts, bör djuret kylas (inte frysas) vid en temperatur som är tillräckligt låg för att minimera autolys. Obduktioner ska utföras så snart som möjligt, vanligtvis inom en dag eller två. Alla betydande patologiska förändringar bör registreras för varje djur med särskild uppmärksamhet på eventuella förändringar i luftvägarna.

45. Ytterligare undersökningar inklusive a priori genom beräkning kan anses utöka studiens tolkningsvärde, såsom mätning av lungvikt hos överlevande råttor, och/eller ge prov på irritation genom den mikroskopiska undersökningen av luftvägarna. Undersökta organ kan också innefatta sådana som uppvisar betydande skador och som härrör från djur som överlevt 24 timmar eller mer, och organ kända för, eller som förväntas, att påverkas. Mikroskopisk undersökning av hela luftvägarna kan ge användbar information om testkemikalier som är reaktiva med vatten, såsom syror och hygroskopiska testkemikalier.

DATA OCH RAPPORTERING

Data

46. Individuella data om kroppsvikt och obduktionsfynd bör tillhandahållas. Kliniska observationsdata bör sammanfattas i tabellform, som för varje testgrupp visar antalet djur som använts, antalet djur som visar tecken på toxicitet, antalet djur som avlidit under testet eller som avlivats av humanitära skäl, tidpunkten då det enskilda djuret har avlidit, beskrivning och tidsförlopp för toxiska verkningar och reversibilitet, samt obduktionsfynd.

Testrapport

47. Testrapporten ska omfatta följande information, när så är lämpligt:

Försöksdjur och djurhållning

— Beskrivning av burförhållanden, inklusive antal (eller förändring av antal) djur per bur, strö, omgivningstemperatur och relativ fuktighet, ljusperiod och identifiering av kost.

— Art/stam som används och motivering för användning av andra arter än råtta.

— Djurens antal, ålder och kön.

— Metod för randomisering.

— Uppgifter om foder- och vattenkvalitet (inbegripet kosttyp/-källa och vattenförsörjning).

— Beskrivning av eventuella förtestbetingelser inbegripet kost, karantän och behandling av sjukdomar.

▼M4

Testkemikalie

— Fysikalisk natur, renhet och, i förekommande fall, fysikalisk-kemiska egenskaper (inbegripet isomerisering).

— Identifieringsdata och CAS-nummer (Chemical Abstract Services), om detta är känt.

Vehikel

— Motivering för användning av vehikel och valet av vehikel (om annat än vatten).

— Historiska eller parallella data som visar att vehikeln inte påverkar studiens slutresultat.

Inhalationskammare

— Beskrivning av inhalationskammaren inklusive mått och volym.

— Ursprung och beskrivning av utrustning som används för exponering av djur så väl som generering av atmosfär.

— Utrustning för mätning av temperatur, fuktighet, partikelstorlek och faktisk koncentration.

— Luftkälla och behandling av luft som tillförs/extraheras och system som används för luftkonditionering.

— Metoder som används för kalibrering av utrustning för att säkerställa en homogen testatmosfär.

— Tryckskillnad (positiv eller negativ).

— Exponeringsportar per kammare (enbart nos), placering av djur i systemet (helkropp).

— Temporal homogenitet/stabilitet för testatmosfären.

— Placering av temperatur- och fuktighetsgivare och provtagning av testatmosfären i kammaren.

— Luftflödeshastigheter, port för luftflöde och exponering (enbart nos), eller djurbelastning och kammare (helkropp).

— Information om utrustningen som används för att mäta syre och koldioxid, i förekommande fall.

— Tid som krävs för att uppnå jämvikt i inhalationskammaren (t_{95}).

— Antal volymutbyten per timme.

— Mätutrustning (i förekommande fall).

Exponeringsdata

— Grunden för valet av målkoncentration i huvudstudien.

— Nominella koncentrationer (den totala massan av testkemikalien som genereras i inhalationskammaren dividerad med luftvolymen som passerar genom kammaren).

— Faktiska koncentrationer av testkemikalier som uppsamlats från djurens andningsapparat, för blandningar som bildar heterogena fysikaliska former (gaser, ångor, aerosoler), där var och en analyseras separat.

▼M4

— Alla luftkoncentrationer ska rapporteras i viktenheter (t.ex. mg/l, mg/m^3, etc.). Enheter för volym (t.ex. ppm, ppb etc.) kan också redovisas inom parantes.

— Partikelstorleksfördelning, aerodynamisk massmediandiameter (MMAD) och geometrisk standardavvikelse (σg), inklusive metoderna för deras beräkning. Individuella partikelstorleksanalyser bör rapporteras.

Testbetingelser

— Uppgifter om beredning av testkemikalien, inklusive uppgifter om eventuella procedurer som använts för att minska partikelstorleken hos fasta material eller för att bereda testlösningar. I de fall där mekaniska processer kan ha förändrat testkemikaliens sammansättning ska analysresultaten inkluderas för att bekräfta dess sammansättning.

— En beskrivning (helst med ett diagram) av utrustningen som används för att generera testatmosfären och exponera djuren för denna atmosfär.

— Uppgifter om den kemiska analysmetod som använts och metodvalidering (inklusive effektiviteten för återvinningen av testkemikalien från provtagningsmediet).

— Grunden för valet av testkoncentration.

Resultat

— Tabelluppställning av kammarens temperatur, fuktighet och luftflöde.

— Tabelluppställning av kammarens nominella och faktiska koncentrationsdata.

— Tabelluppställning av partikelstorleksdata som omfattar provtagningsdata, partikelstorleksfördelning och beräkning av MMAD och σ_g.

— Tabelluppställning av responsdata och koncentrationsnivåer för varje djur (dvs. djur som uppvisar tecken på toxicitet inklusive mortalitet, natur, allvarlighetsgrad, tidpunkt för första tecknet och effekternas varaktighet).

— Djurens individuella kroppsvikt som samlats in under studien, datum och tid för dödsfall som inträffat före planerad avlivning, tidsförlopp för första tecknen på toxicitet och om dessa var reversibla för varje enskilt djur.

— Obduktionsfynd och histopatologiska fynd för varje djur, om detta finns tillgängligt.

— Dödlighetsuppskattning (t.ex. LC_{50}, LD_{01}) inklusive 95 % konfidensgräns, och lutning (om det tillhandahålls av utvärderingsmetoden).

— Statistisk relation, inklusive uppskattningen av exponenten n (k × t-protokoll). Namnet på den statistiska programvara som används bör tillhandahållas.

▼M4

Diskussion och tolkning av resultaten

— Särskild uppmärksamhet bör ges till beskrivningen av använda metoder för att uppfylla kriterierna för den här testmetoden, t.ex. koncentrationsgräns eller partikelstorlek.

— Partiklarnas andningsbarhet i ljuset av de övergripande resultaten bör åtgärdas, särskilt om kriterierna för partikelstorlek inte kunde uppfyllas.

— En förklaring bör ges om det fanns ett behov av att avliva djur av humanitära skäl som visade tecken på uppenbar smärta eller svårt och ihållande lidande, på grundval av kriterierna i OECD:s vägledningsdokument om humana endpoints (8).

— Om testning enligt kapitel B.52 i denna bilaga (4) avbröts till förmån för testmetod B.2, bör motivering för detta lämnas.

— Överensstämmelsen mellan metoderna som används för att bestämma nominell och faktisk koncentration, och förhållandet mellan faktisk och nominell koncentration bör ingå i den samlade bedömningen av studien.

— Den sannolika dödsorsaken och dominerande verkningsmekanism (systematisk mot lokal) bör behandlas.

LITTERATUR

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

(3) Europaparlamentets och rådets förordning (EG) nr 1272/2008 av den 16 december 2008 om klassificering, märkning och förpackning av ämnen och blandningar, ändring och upphävande av direktiven 67/548/EEG och 1999/45/EG samt ändring av förordning (EG) nr 1907/2006 (EUT L 353, 31.12.2008, s. 1).

(4) Kapitel B.52 i denna bilaga, akut inhalationstoxicitet – akut toxicitetsklass.

(5) Kapitel B.40 i denna bilaga, in vitro-test av hudkorrosivitet: bestämning av transkutant elektriskt motstånd (TER).

(6) Kapitel B.40a i denna bilaga, in vitro-test av hudkorrosivitet: test med modell av human hud.

(7) OECD (2005). In Vitro Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 435, OECD, Paris. Finns 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, OECD, Paris. Finns 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 and Thiel A (2007). A Simple Approach to Validation of Directed-Flow Nose-Only Inhalation Chambers. J. Appl. Toxicol. 27: 160–167.

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

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

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

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

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

DEFINITION

Testkemikalie: Alla ämnen eller blandningar som testas med denna testmetod.

▼M4

Tillägg 1

K × t-protokoll

1. En stegvis koncentration × tid-studie (k × t) kan övervägas som ett alternativ till det traditionella protokollet för bedömning av inhalationstoxicitet (12) (13) (14). Den bör företrädesvis utföras när det finns ett specifikt regelverk eller vetenskapligt behov som kräver testning av djur under flera tidsperioder, såsom katastrofhanterings- eller markanvändningsplanering. Detta tillvägagångssätt börjar med ett test vid en koncentrationsgräns (exponeringssession 1) i vilka djuren exponeras för en testkemikalie under fem tidsperioder (t.ex. 15, 30, 60, 120 och 240 minuter) så att flera löptider kommer att erhållas inom en exponeringssession (se figur 1). När förordning (EG) nr 1272/2008 används, är respektive koncentrationsgräns för gaser, ångor och aerosoler 20 000 ppm, 20 mg/l och 5 mg/l. Dessa nivåer kan endast överskridas om det finns ett specifikt regelverk eller vetenskapligt behov som kräver testning vid dessa nivåer (se punkt 37 i B.2 i huvudtexten).

2. I situationer där det finns lite eller ingen information om en testkemikalies toxicitet, bör en inledande studie utföras, i vilken grupper om maximalt 3 djur per kön exponeras för de målkoncentrationer som försöksledaren har valt, vanligtvis i 240 minuter.

3. Om en koncentrationsgräns testas under exponeringssession 1 och lägre mortalitet än 50 % observeras, behövs inga ytterligare tester utföras. Om det finns ett regelverk eller vetenskapligt behov av att fastställa förhållandet koncentration/tid/respons för högre nivåer än den angivna koncentrationsgränsen bör nästa exponering utföras vid en högre nivå som t.ex. två gånger koncentrationsgränsen (dvs. 2 L i figur 1).

4. Om toxicitet observeras vid koncentrationsgränsen behöver ytterligare tester utföras (huvudstudie). Dessa exponeringar utförs antingen vid lägre koncentrationer (i figur 1: exponeringssession II, III eller IV) eller högre koncentrationer med kortare varaktigheter (i figur 1: exponeringssession IV) med anpassade tidsperioder som inte är så vitt åtskilda.

5. Testet (inledande koncentration och ytterligare koncentrationer) utförs med 1 djur/kön per koncentration/tidpunkt eller med 2 djur av det mer mottagliga könet per koncentration/tidpunkt. Under vissa omständigheter kan försöksledaren välja att använda 2 råttor per kön per koncentration/tidpunkt (eller 4 djur av det mer mottagliga könet per koncentration/tidpunkt) (15). Att använda 2 djur per kön per koncentration och tidpunkt kan generellt minska förutfattade meningar angående uppskattningarnas variation, öka framgångsgraden och förbättra konfidensintervallets täckning i förhållande till det protokoll som beskrivs här. Mer information finns i GD 39 (2).

6. Helst ska varje exponeringssession genomföras på en dag. Detta ger möjlighet att fördröja nästa exponering tills det finns en rimlig garanti för överlevnad, och det gör att försöksledaren kan justera målkoncentrationen och tidsperioden för nästa exponeringssession. Det rekommenderas att börja varje exponeringssession med den grupp som kommer att exponeras längst, t.ex. gruppen för exponering i 240 minuter följt av den som exponeras i 120 minuter, och så vidare. Om, till exempel, djur i 240-minutersgruppen dör efter 90 minuter eller uppvisar allvarliga tecken på toxicitet (t.ex. extrema förändringar i andningsmönster såsom ansträngd andning) är det inte meningsfullt att utsätta en grupp för 120 minuter eftersom dödligheten sannolikt skulle vara 100 %. Därför bör försöksledaren välja kortare exponeringstider för den koncentrationen (t.ex. 90, 65, 45, 33 och 25 minuter).

▼M4

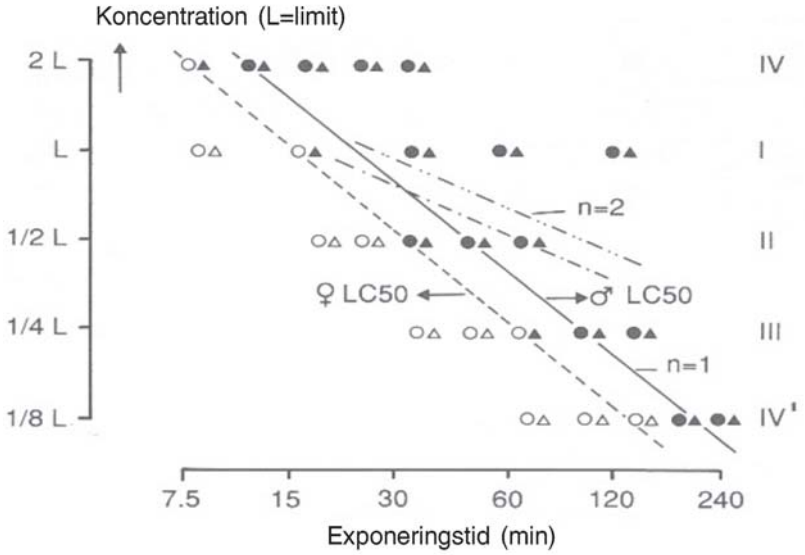
7. Kammarens koncentration bör mätas ofta för att bestämma den tidsviktade genomsnittskoncentrationen för varje exponeringsvaraktighet. När det är möjligt bör tidpunkten för dödsfallet för varje djur (snarare än exponeringsvaraktighet) användas för den statistiska analysen.

8. Man bör se närmare på resultaten från de fyra första exponeringssessionerna för att identifiera luckor i koncentration-tidskurvan (se figur 1). Vid en otillräcklig tillpassning bör en ytterligare exponering (5:e koncentration) genomföras. Koncentrations- och exponeringsvaraktigheter för den 5:e exponeringen bör väljas för att täcka denna lucka.

9. Alla exponeringssessioner (inklusive den första exponeringssessionen) används för att beräkna förhållandet koncentration-tid-respons med hjälp av statistisk analys (16). Om det är möjligt ska för varje k × t-intervall det tidsviktade medelvärdet och exponeringsvaraktigheten fram till döden användas (om dödsfallet inträffar under exponeringen).

Figur 1

Hypotetisk illustration av förhållandet koncentration-tid-mortalitet för råttor



Ofyllda symboler = överlevande; fyllda symboler = döda djur

Trianglar = honor; cirklar = hanar

Heldragen linje = LC_{50}-värden (7,5–240 min) för hanar med n = 1

Streckad linje = LC_{50}-värden (7,5–240 min) för honor med n = 1

Prickad linje = hypotetiska LC_{50}-värdeslinjer för hanar och honor om n hade varit lika med 2 (12).

Ordförklaringar

Koncentration:

Exponeringstid:

▼M4

10. Nedan finns ett exempel på ett stegvist förfarande:

Exponeringssession 1 – testning vid koncentrationsgräns (se figur 1)

— 1 djur/kön per koncentration/tidpunkt, totalt ([a])

— Målkoncentration ([b]) = koncentrationsgräns.

— Exponera fem grupper av djur för denna målkoncentration för respektive varaktighet 15, 30, 60, 120 och 240 minuter.

↓

Exponeringssession II ([c]) – huvudstudie

— 1 djur/kön per koncentration/tidpunkt, totalt 10 djur.

— Exponera fem grupper av djur vid en lägre koncentration ([d]) (1/2 l) med något längre exponeringsvaraktigheter (faktor √2 utspritt; se figur 1).

↓

Exponeringssession III – huvudstudie

— 1 djur/kön per koncentration/tidpunkt, totalt 10 djur.

— Exponera fem grupper av djur vid en lägre koncentration ([d]) (1/4 l) med något längre exponeringsvaraktigheter (faktor √2 utspritt; se figur 1).

↓

Exponeringssession IV′ – huvudstudie

— 1 djur/kön per koncentration/tidpunkt, totalt 10 djur.

— Exponera fem grupper av djur vid en lägre koncentration ([d]) (1/8 l) med något längre exponeringsvaraktigheter (faktor √2 utspritt; se figur 1).

↓ eller

([a]) Om det inte finns någon information tillgänglig om könsmottaglighet används råttor av båda könen, dvs. 1 djur/kön per koncentration. Baserat på befintlig information eller om det blir uppenbart under denna exponeringssession att ett kön är mer mottagligt, används 10 djur av det mer mottagliga könet (2 djur per koncentration/tidpunkt) för varje koncentrationsnivå under efterföljande testning.10 djur

([b]) När förordning (EG) nr 1272/2008 används, är respektive koncentrationsgräns för gaser, ångor och aerosoler 20 000 ppm, 20 mg/l och 5 mg/l. Vid förväntad toxicitet, eller baserat på resultaten från det inledande testet, bör lägre startkoncentrationer väljas. I fall av regulatoriska eller vetenskapliga behov kan högre koncentrationer användas.

([c]) Helst ska exponering av djur vid nästa koncentrationsnivå fördröjas tills det finns rimlig anledning att anta att de tidigare testade djuren överlever. Detta gör att försöksledaren kan justera målkoncentration och varaktighet för nästa exponeringssession.

([d]) Den minsta dosering (koncentration × tid) som resulterade i mortalitet vid den inledande koncentrationen (första exponeringssessionen) gäller som vägledning för att fastställa nästa kombination av koncentration och exponeringsvaraktighet. Normalt minskas koncentrationen tvåfaldigt (1/2 l) och djuren exponeras under ett nytt tidsintervall med ett finare rutnät av geometrisk uppdelning av exponeringsperioder med faktor 1,4 (√2; se hänvisning 11) runt tiden för den minsta letala dosnivån (tid × koncentration) som observerades under den första exponeringen. I denna figur (figur 1), observerades mortalitet först i exponeringssession I efter 15 min., varaktigheterna under session II centreras därför omkring 30 min., och är 15, 21 30, 42 och 60 min. Efter de första två exponeringarna rekommenderas att plotta datan i en liknande figur som visas ovan, och att kontrollera att förhållandet mellan koncentration och tid har en vinkel på 45 grader (n = 1), eller om förhållandet koncentration-tid-respons är mindre brant (t.ex. n = 2) eller brantare (t.ex. n = 0,8). I de senare fallen rekommenderas det att anpassa efterföljande koncentrationer och varaktigheter enligt detta.

▼M4

Exponeringssession IV – huvudstudie

— 1 djur/kön per koncentration/tidpunkt, totalt 10 djur.

— Exponera fem grupper av djur vid en högre koncentration ([e]) (2 l) med något kortare exponeringsvaraktigheter (faktor $\sqrt{2}$ utspritt; se figur 1).

Matematisk behandling av resultaten för k × t-protokollet

11. Ett k × t-förfarande med 4 eller 5 exponeringskoncentrationer och fem varaktigheter ger 20 respektive 25 datapunkter. Med dessa datapunkter kan k × t-förhållandet beräknas med hjälp av statistisk analys (16):

Ekvation 1:

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

där C = koncentration; t = exponeringstid, eller

Ekvation 2:

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

där $n = b_1/b_2$.

Med hjälp av ekvation 1 kan LC_{50}-värdet beräknas för en given tidsperiod (t.ex. 4 timmar, 1 timme, 30 minuter eller valfri tidsperiod inom intervallet för testets tidsperioder) med P = 5 (50 % respons). Observera att Habers lag endast är tillämplig när n = 1. LC_{01} kan beräknas med hjälp av P = 2,67.

([e]) I vissa fall kan det vara nödvändigt att öka koncentrationen (2 l) under ett nytt tidsintervall med ett ännu finare rutnät av geometrisk uppdelning av exponeringsperioder med faktor 1,4 ($\sqrt{2}$) omkring tiden för den minsta letala koncentrationsnivån som observerades under den första exponeringen. Den minsta exponeringstiden bör helst överstiga 5 minuter, den maximala exponeringstiden bör inte överstiga 8 timmar.

▼B

B.3 AKUT TOXICITET (DERMALT)

1. METOD

1.1 INLEDNING

Se allmän inledning till del B (A).

1.2 DEFINITIONER

Se allmän inledning till del B (B).

1.3 REFERENSÄMNEN

Inga.

1.4 TESTMETODSPRINCIP

Testämnet appliceras i graderade doser på huden till flera grupper av försöksdjur, en bestämd dos per grupp. Därefter observeras effekter och dödsfall. Djur som dör under försöket ska obduceras och i slutet av försöket obduceras överlevande djur.

Det kan vara nödvändigt att på ett humant sätt avliva djur som uppvisar ihållande tecken på stark smärta och lidande. Undersökningar av ämnen på ett sätt som på grund av deras frätande eller irriterade egenskaper vållar avsevärd smärta och lidande behöver inte utföras.

1.5 KVALITETSKRITERIER

Inga.

1.6 METODBESKRIVNING

1.6.1 **Förberedelser**

I minst fem dagar före försöket ska djuren hållas under testbetingelserna vad beträffar miljö och utfodring. Före försöket fördelas friska könsmogna djur slumpmässigt i behandlingsgrupper. Ungefär 24 timmar före testet ska päls avlägsnas från djurens rygg genom klippning eller rakning. Vid klippning eller rakning ska försiktighet iakttas så att huden inte skadas, eftersom det kan ändra dess genomtränglighet. Minst 10 % av kroppsytan ska göras klar för applicering av testämnet. Vid test av fasta ämnen, som får pulvriseras om det är lämpligt, ska testämnet fuktas tillräckligt med vatten eller, vid behov med lämplig vehikel, för att säkerställa god kontakt med huden. När vehikel används ska hänsyn tas till vehikelns inverkan på testämnets penetrering av huden. Flytande testämnen används vanligen outspädda.

1.6.2 **Testbetingelser**

1.6.2.1 *Försöksdjur*

Könsmogna råttor eller kaniner får användas. Andra arter kan användas men i så fall ska detta motiveras. De vanligen nyttjade laboratoriestammarna ska användas. För både han- och honkön gäller att vikten hos djur som används i ett försök inte får avvika mer än ± 20 % från en rimlig genomsnittsvikt.

▼B

1.6.2.2 *Antal och kön*

Minst 5 djur ska användas på varje dosnivå. De ska alla vara av samma kön. Om hondjur används får de inte ha fött ungar och får inte vara dräktiga. Om det finns information som visar att ett kön är väsentligt mer känsligt ska djur av detta kön användas.

Anmärkning: Vid användning av djur som är högre upp i näringskedjan än gnagare vid tester av akut toxicitet ska man överväga användning av ett mindre antal djur. Doserna ska fastställas med omsorg och man ska anstränga sig för att inte utnyttja högre doser än moderat toxiska doser. Vid sådana undersökningar bör tillförsel av dödliga doser av testämnet undvikas.

1.6.2.3 *Dosnivåer*

Till försöket ska användas ett tillräckligt antal dosnivåer, minst tre, som ska vara så valda att man får en gra-dering av de toxiska verkningarna och av dödligheten i behandlingsgrupperna. När dosnivåerna bestäms ska hänsyn tas till eventuellt irriterande eller trätande effekter. Datauppgifterna ska vara tillräckliga för framställning av en dos-/responskurva och, om möjligt, för att medge en rimlig bestämning av LD_{50}.

1.6.2.4 *Gränstest*

Ett gränstest med en dosnivå av minst 2 000 mg/kg kroppsvikt kan utföras med en grupp av fem djur av varje kön enligt ovan beskrivna förfarande. Om ämnesrelaterade dödsfall inträffar bör en fullständig undersökning övervägas.

1.6.2.5 *Observationsperiod*

Observationstiden ska vara minst 14 dagar. Observationstiden ska emellertid inte vara strikt fastställd utan ska bestämmas utifrån de toxiska reaktionerna, tidpunkten för deras uppträdande och återhämtningsperiodens längd. Den kan följaktligen förlängas när detta anses nödvändigt. Tidpunkten vid vilken tecken på toxicitet uppträder respektive försvinner och tidpunkten för dödsfall är viktiga, särskilt om det finns en tendens till att sena dödsfall inträffar.

1.6.3 **Förfarande**

Djuren ska hållas i var sin bur. Testämnet ska appliceras jämnt över ett område som motsvarar ungefär 10 % av den totala kroppsytan. Vid användning av kraftigt toxiska ämnen kan en mindre yta täckas, men ämnet ska appliceras på ytan i ett så tunt och jämnt lager som möjligt.

Testämnen ska hållas i kontakt med huden med en porös gaskompress och icke hudirriterande tejp under en 24 timmar lång exponeringstid. Testytan ska vidare täckas på lämpligt sätt för att säkerställa att gaskompressen och testämnet hålls på plats så att djuren inte kan svälja testämnet. För att förhindra att djuren intar testämnet kan

▼B

rörelsehindrande anordningar användas, men total immobilisering rekommenderas inte.

I slutet av exponeringsperioden ska resterande testämne avlägsnas, i lämpliga fall med vatten eller med annan lämplig metod för rengöring av huden. Observationer ska registreras systematiskt när de görs. Varje enskilt djur ska registreras separat. Den första dagen ska täta observationer göras. En grundlig klinisk undersökning ska göras minst en gång varje arbetsdag, andra observationer ska göras dagligen och lämpliga åtgärder ska vidtas för att minimera förlust av djur som ingår i studien, t.ex. ska djur som hittas döda obduceras eller nedfrysas och svaga eller döende djur ska isoleras eller avlivas.

Observation av djuren i burarna ska omfatta pälsförändringar, behandlad hud, ögon och slemhinnor, respirations- och cirkulationssystem, autonoma och centrala nervsystemet samt kroppsmotorik och beteendemönster. Särskilt uppmärksamhet ska ägnas åt observation av skälvningar, kramper, salivavsöndring, diarré, letargi, sömn och koma. Tidpunkten för dödsfall ska registreras så noggrant som möjligt. Djur som dör under försöket ska obduceras och i slutet av försöket ska överlevande djur obduceras. Alla makroskopiska patologiska förändringar ska registreras. När det är indicerat ska vävnadsprov tas för histopatologisk undersökning.

Bedömning av toxicitet bos det motsatta könet

Sedan en undersökning av det ena könet avslutats ska minst en grupp med fem djur av det motsatta könet testas för att fastställa om djur av detta kön är avsevärt mer känsliga för testämnet. I vissa fall kan användning av färre djur vara motiverat. Om det finns tillräckligt med information om att djur av det kön som har testats är avsevärt mer känsliga, behöver djur av det motsatta könet inte testas.

2. **DATA**

Data ska ställas upp i tabellform och för varje behandlingsgrupp ska anges antal djur i början av försöket, tidpunkten för enskilda djurs dödsfall, antal djur som visar andra tecken på toxicitet, beskrivning av toxiska effekter och obduktionsfynd. De enskilda försöksdjurens vikt ska bestämmas och registreras omedelbart innan testämnet appliceras, därefter varje vecka och vid dödsfall. Viktförändringar ska beräknas och registreras om överlevnaden överstiger en dag efter applicering av testämnet. Avlivning av djur på ett humant sätt till följd av ämnesrelaterat lidande och smärta ska registreras som ämnesrelaterade dödsfall. LD_{50} ska bestämmas enligt en erkänd metod.

Utvärderingen av data ska omfatta eventuellt samband mellan djurens exponering för testämnet och omfattningen och svårighetsgraden av alla abnormiteter, inklusive beteendemässiga och kliniska abnormiteter, makro-skopiska lesioner, ändringar av kroppsvikt, dödlighet och eventuella andra toxikologiska effekter.

3. **RAPPORTERING**

3.1 TESTRAPPORT

Testrapporten ska om möjligt innehålla följande uppgifter:

▼B

— Djurart, stam, härkomst, miljöbetingelser, foder osv.

— Testbetingelser (inklusive metod för hudrengöring och slag av bandage: med eller utan ocklusion).

— Dosnivåer (med angivande av vehikel, om sådan används, och koncentrationer).

— Försöksdjurens kön.

— Tabelluppställning av responsdata efter kön och dosnivå (dvs. antal döda djur, antal djur som uppvisar tecken på toxicitet, antal exponerade djur).

— Dödstidpunkt efter dosering, motivering och kriterier för human avlivning av djur.

— Alla observationer.

— LD_{50}-värde för det kön som har varit föremål för en fullständig undersökning bestämt efter 14 dagar med angivande av bestämningsmetod.

— 95 % tillförlitlighetsintervall för LD_{50} (där detta är möjligt).

— Dos-dödlighetskurva och lutning (om bestämningsmetoden medger detta).

— Obduktionsfynd.

— Eventuella histopatologiska fynd.

— Resultat av försök med motsatt kön.

— Diskussion av resultaten (med särskild uppmärksamhet på om human avlivning av djur under försöket kan ha inverkat på det beräknade LD_{50}-värdet).

— Tolkning av resultaten.

3.2 UTVÄRDERING OCH TOLKNING

Se allmän inledning till del B (D).

4. **HÄNVISNINGAR**

Se allmän inledning till del B (E).

▼B

B.4 **AKUT TOXICITET: HUDIRRITATION/HUDKORROSION**

1. **METOD**

Denna testmetod motsvarar OECD TG 404 (2002).

1.1 INLEDNING

Vid utarbetandet av denna uppdaterade metod lades särskilt stor vikt vid möjligheterna till bättre testningsförfaranden, där djurskyddsfrågor beaktas så väl som möjligt. Sådana förfaranden innebär att all existerande information om testämnet utvärderas i syfte att undvika onödiga djurförsök. Metoden inbegriper en rekommendation om att laboratoriet, innan det beskrivna *in* vivo-testet för hudkorrosion/hudirritation utförs, gör en *weight-of-the-evidence-analys* av existerande relevanta data. Om de data som finns att tillgå inte är tillräckliga, kan behövliga data genereras med hjälp av stegvis testning (1). Den rekommenderade testningsstrategin inbegriper validerade och godkända *in* vitro-test (se bilagan till denna metod). Dessutom rekommenderas att de tre testkompresserna, där det är lämpligt, appliceras på djuret i följd, i stället för samtidigt, vid det inledande *in vivo*-testet.

Med hänsyn till sund vetenskaplig praxis och djurens välbefinnande bör *in vivo*-testning inte genomföras förrän alla tillgängliga data som är relevanta för ämnets förmåga att framkalla hudkorrosion/hudirritation har utvärderats genom en *weight-of-the-evidence-analys.* Sådana data är belägg från gjorda undersökningar på människor och/eller försöksdjur, belägg på korrosion/irritation i fråga om ett eller flera strukturellt besläktade ämnen eller blandningar av sådana ämnen, data som demonstrerar att ämnet är stark surt eller alkaliskt (2), (3) samt resultat från validerade och godkända *in vitro-* eller *ex vivo*-test (4), (5), (5a). Genom analysen bör man kunna minska behovet av *in* vivo-testning med avseende på hudkorrosion/hudirritation när det gäller ämnen för vilka det redan finns tillräckliga belägg från andra undersökningar av dessa två end points.

En rekommenderad strategi för stegvis testning, som inbegriper validerade och godkända *in vitro-* eller *ex vivo*-test med avseende på korrosion/irritation finns som bilaga till denna metod. Strategin utvecklades av och rekommenderades enhälligt av deltagarna i en OECD-arbetsgrupp (6). Strategin har antagits som den rekommenderade testningsstrategin i Globally Harmonised System for the Classification of Chemical Sub-stances (GHS) (7). Strategin för stegvis testning ingår inte i testmetod B.4, men användning av den rekommenderas ändå innan man går in för *in vivo*-testning. För nya ämnen rekommenderas den som ett stegvis testningsförfarande för generering av vetenskapligt sunda data om ett ämnes förmåga att framkalla korrosion/irritation. För befintliga ämnen med otillräckliga data om hudkorrosion/hudirritation bör strategin användas för att fylla upp luckor i tillgängliga data. Om en annan testningsstrategi eller en annan procedur används, eller om man beslutar att inte använda ett stegvis testningsförfarande, bör detta motiveras.

Om bestämningen av korrosivitet eller irritationsförmåga inte kan göras med hjälp av en *weight-of-the-evi*dence-analys som står i överensstämmelse med strategin för stegvis testning, bör ett *in vivo*-test övervägas (se bilagan).

▼B

1.2 DEFINITIONER

Hudirritation: Uppkomsten av reversibel skada på huden efter att testämnet har applicerats i upp till 4 timmar.

Hudkorrosion (hudfrätning): Uppkomsten av irreversibel skada på huden i form av synlig nekros genom epidermis och in i dermis, efter att ett testämne har applicerats i upp till fyra timmar. Frätningsreaktioner karakteriseras av sår, blödning, blodiga sårskorpor och, vid slutet av observationsperioden på 14 dagar, avfärgning genom blekning av huden, hela områden med alopeci (håravfall) och ärr. Histopatologi bör övervägas för utvärdering av skador som inte är entydiga.

1.3 PRINCIP FÖR TESTMETODEN

Testämnet appliceras som en engångsdos på försöksdjurets hud. Djurets obehandlade hudområden används som referens. Graden av irritation eller korrosion granskas och poängsätts med specifierade intervall, och beskrivs närmare i syfte att få en fullständig utvärdering av verkningarna. Testet bör pågå tillräckligt länge för att ge möjlighet att utvärdera om de observerade verkningarna är reversibla eller irreversibla.

Djur som uppvisar ihållande tecken på allvarligt lidande eller smärta vid något skede av testningen bör avlivas på ett skonsamt sätt, och detta bör beaktas vid utvärderingen av ämnet. Kriterier för att fatta beslut om skonsam avlivning av döende eller svårt lidande djur finns i hänvisning (8).

1.4 BESKRIVNING AV TESTMETODEN

1.4.1 **Förberedelser för *in vivo-test***

1.4.1.1 *Val av djurart*

Rekommenderat försöksdjur är albinokanin. Friska, unga vuxna exemplar bör användas. Om andra arter används bör detta motiveras.

1.4.1.2 *Förberedelse av djuren*

Cirka 24 timmar före testet bör djurens päls avlägsnas genom kortklippning av flankens ryggsida. Varsamhet bör iakttas för att inte repa huden, och endast djur med frisk och intakt hud bör användas.

Kaniner från vissa stammar har områden med speciellt tät päls, särskilt under vissa årstider. Sådana områden bör inte användas för testning.

1.4.1.3 *Förvarings- och utfodringsbetingelser*

Djuren ska inhysas individuellt. Temperaturen i försöksdjurens utrymmen bör vara 20 °C (± 3 °C) för kaniner. Den relativa fuktigheten bör vara minst 30 % och ska helst inte överstiga 70 %, utom när rummet rengörs. Målvärdet bör dock vara 50–60 %. Belysningen bör vara artificiell med omväxlande 12 timmar ljus och 12 timmar mörker. Konventionellt laboratoriefoder kan användas för utfodringen, och djuren bör ha obegränsad tillgång till dricksvatten.

▼B

1.4.2 **Testförfarande**

1.4.2.1 *Applicering av testämnet*

Testämnet appliceras på en liten yta (cirka 6 cm^2) av huden och täcks med en kompress som hålls på plats med ett icke-irriterande häftförband. Om det inte är möjligt att applicera ämnet direkt (exempelvis vätskor eller vissa pastor) bör ämnet först appliceras på kompressen, som därefter placeras på huden. Kompressen ska under exponeringsperioden hållas i lös kontakt med huden med hjälp av ett lämpligt halvocklusivt förband. Om testämnet appliceras på kompressen bör denna fästas vid huden på sådant sätt att det finns god kontakt och en jämn fördelning av ämnet på huden. Man bör se till att djuret inte når kompressen, eller kan äta eller andas in ämnet.

Ämnen i vätskeform används i regel outspädda. Vid testning av fasta ämnen (som vid behov kan pulverise-ras) ska ämnet vätas med minsta möjliga mängd vatten (eller vid behov någon annan lämplig vehikel), som behövs för att säkerställa god hudkontakt. Om annan vehikel än vatten används bör vehikelns potentiella inverkan på den hudirritation som testämnet framkallar vara minimal eller noll.

I slutet av exponeringsperioden (som i regel varar fyra timmar) ska överskottsämne om möjligt avlägsnas med vatten eller ett lämpligt lösningsmedel, utan att störa existerande respons eller skada huden.

1.4.2.2 *Dosnivå*

En dos på 0,5 ml vätska eller 0,5 g fast ämne eller pasta appliceras på huden.

1.4.2.3 *Inledande test (test avseende hudirritation/hudkorrosion* in vivo *på ett enskilt djur)*

Det rekommenderas starkt att ett första *in* vivo-test görs på ett enskilt djur, särskilt om det föreligger misstanke om att ämnet kan vara korrosivt. Detta är i enlighet med strategin för stegvis testning (se bilaga 1).

Om ett ämne har bedömts vara korrosivt på grundval av en *weight-of-the-evidence*-analys, behövs ingen ytterligare testning på djur. För de flesta ämnen som misstänks vara korrosiva, behövs i regel ingen ytterligare *in* vivo-testning. I fall där det på grund av otillräckliga bevis är motiverat att generera ytterligare data, kan begränsade test på djur genomföras enligt följande princip: Upp till tre testkompresser appliceras sekventiellt på djuret. Den första kompressen tas bort efter tre minuter. Om ingen allvarlig hudreaktion kan observeras, appliceras en andra kompress, som i sin tur tas bort efter en timme. Om observationerna i detta skede tyder på att exponeringen kan förlängas till fyra timmar utan lidande för testdjuret, appliceras en tredje kompress, som tas bort efter fyra timmar. Därefter kan responsen graderas.

Om korrositivitet kan observeras efter någon av de tre sekventiella exponeringarna, avslutas testet omedelbart. Om ingen korrosion observeras efter att den sista kompressen har tagits bort, hålls djuret under observation i 14 dagar, utom om korrosion framkallas tidigare.

▼B

I fall där testämnet inte förväntas framkalla korrosion men där det kan vara irriterande, appliceras en enstaka kompress på ett djur i fyra timmar.

1.4.2.4 *Bekräftande test (*in vivo*-test avseende hudirritation med ytterligare djur)*

Om ingen korrosion observeras vid det inledande testet bör irritationsrespons eller negativ respons bekräftas med hjälp av ytterligare två djur. En kompress appliceras på vardera djuret för en exponeringsperiod på fyra timmar. Om irritation har observerats vid det inledande testet, kan bekräftelsetestet göras enligt det sekventiella förfarandet eller genom samtidig exponering på ytterligare två djur. Om inledande test i undantagsfall inte utförs, kan två eller tre djur behandlas med en enskild kompress som tas bort efter fyra timmar. Om två djur används, och samma respons observeras hos båda, behövs ingen ytterligare testning. I annat fall testas även det tredje djuret. Om den respons som observeras inte är entydig, kan det vara nödvändigt att klargöra responsen med hjälp av ytterligare djur.

1.4.2.5 *Observationsperiod*

Observationsperioden bör vara tillräckligt lång för att man till fullo ska kunna utvärdera om de observerade verkningarna är reversibla eller inte. Försöket bör dock avslutas omedelbart, oavsett hur länge det pågått, om ett djur uppvisar tecken på svåra smärtor eller lidande. För utvärderingen av om verkningarna är reversibla, bör djuren observeras i upp till 14 dagar efter att kompresserna har tagits bort. Om reversibilitet kan observeras innan 14 dagar har gått kan försöket omedelbart avslutas.

1.4.2.6 *Kliniska observationer och gradering av hudreaktionerna*

Alla djur bör undersökas för tecken på erytem och ödem, och den respons som erhållits vid 60 minuter och därefter vid 24, 48 och 72 timmar efter borttagning av kompresserna registreras. Vid inledande test på ett enskilt djur undersöks applikationsstället omedelbart efter att kompressen har tagits bort. Hudreaktionerna graderas och registreras enligt klassificeringsskalan i tabellen nedan. Om djuret har fått en hudskada som vid 72 timmar inte kan identifieras som irritation eller korrosion, kan observationer behövas fram till dag 14 för att avgöra om verkningarna är reversibla. Utöver observationerna av irritation, bör alla lokala toxiska effekter, såsom avfettning av huden och alla eventuella systemiska skadliga verkningar (exempelvis kliniska tecken på toxicitet eller verkningar på kroppsvikten) till fullo beskrivas och registreras. I fall av tvetydig respons bör en histopatologisk undersökning övervägas i klargörande syfte.

Graderingen av hudrespons är oundgängligen subjektiv. För att främja en harmonisering i fråga om graderingen av hudrespons och som stöd för testningslaboratorier och alla som är med om att utföra och tolka observationer, bör den personal som gör observationsarbetet få tillbörlig utbildning i det poängsättnings-system som används (se tabellen nedan). En illustrerad vägledning för gradering av hudirritation och andra hudskador kan vara till hjälp (9).

2. **DATA**

2.1 PRESENTATION AV RESULTATEN

Undersökningens resultat bör sammanställas i tabellform i den slutliga testrapporten. Resultaten bör omfatta alla aspekter som uppräknas i avsnitt 3.1.

▼B

2.2 UTVÄRDERING AV RESULTATEN

Graderna av hudirritation bör bedömas med hänsyn till skadornas natur och allvarlighetsgrad samt till om skadorna är reversibla eller irreversibla. Individuella resultat av graderingen representerar ingen absolut standard för ett ämnes förmåga att framkalla irritation, eftersom även andra verkningar av testämnet utvärderas. De enskilda bedömningarna bör däremot ses som referensvärden, som bör utvärderas i kombination med alla andra observationer från undersökningen.

Reversibiliteten hos hudskador bör beaktas när man utvärderar respons med avseende på irriterande egenskaper. Om verkningar av typen alopeci (begränsat område), hyperkeratos, hyperplasi och flagning håller i till slutet av den 14 dagar långa observationsperioden, bör testämnet betraktas som irriterande.

3. **RAPPORTERING**

3.1 TESTRAPPORT

Testrapporten ska innehålla nedan angivna uppgifter.

Motivering för *in vivo*-testning: *weight-of-evidence-analys* av tidigare existerande data, inbegripet resultat från stegvis testning enligt den rekommenderade strategin, enligt följande:

— Beskrivning av relevanta data som erhållits före testningen.

— Data som erhållits från de enskilda stegen enligt testningsstrategin.

— Beskrivning av utförda *in vitro*-test, inbegripet detaljerade uppgifter om förfaranden och resultat som erhållits med test- och referensämnen.

— *Weight-of-the-evidence*-analys för utförandet av *in vivo*-test.

Testämne:

— Identifieringsdata (t.ex. CAS-nummer, källa, renhet, kända orenheter, satsnummer),

— Fysikalisk natur och fysikalkemiska egenskaper (till exempel pH, flyktighet, löslighet, stabilitet).

— För blandningar anges sammansättning och beståndsdelarnas relativa andelar (i procent).

Vehikel:

— Identifieringsdata, koncentration (om tillämpligt), volym som har använts.

— Motivering för valet av vehikel.

Testdjur:

— Art och stam som har använts, motivering om albinokanin inte har använts.

— Antalet djur per kön.

— De enskilda djurens vikt vid testets start och slut.

— Djurens ålder vid testets start.

— Ursprung, förvarsförhållanden, foder och dylikt.

▼B

Testbetingelser:

— Teknik som använts för att förbereda appliceringsstället.

— Detaljerade uppgifter om de kompressmaterial som har använts och om förbandstekniken.

— Detaljerade uppgifter om beredning, applicering och borttagning av testämnet.

Resultat:

— En tabell med graderad irritations-/korrosionsrespons för varje djur vid alla observationspunkter.

— Beskrivningar av alla observerade skador.

— Beskrivande redogörelse av naturen och graden av den irritation eller korrosion som har observe rats samt eventuella histopatologiska fynd.

— Beskrivning av övriga skadliga lokala (till exempel avfettning av huden) och systemiska verkningar utöver hudirritation eller hudkorrosion.

Diskussion om resultaten.

4. **HÄNVISNINGAR**

1. Barratt, M.D., Castell, J.V., Chamberlain, M., Combes, R.D., Dearden, J.C., Fentem, J.H., Gerner, I., Giuliani, A., Gray T.J.B., Livingston, D.J., Provan, W.M., Rutten, F.A.J.J.L., Verhaar, H.J.M., Zbinden, P. (1995), The Integrated Use of Alternative Approaches for Predicting Toxic Hazard. ECVAM Workshop Report 8. ATLA 23, 410–429.

2. 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. *InVitro,* 2, 19–26.

3. Worth, A.P., Fentem, J.H., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Liebsch, M. (1998), Evaluation of the proposed OECD Testing Strategy for skin corrosion. ATLA 26, 709–720.

4. ECETOC (1990), Monograph No. 15, Skin Irritation, European Chemical Industry, Ecology and Toxicology Centre, Brussels.

5. 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.

5a. Testing Method B.40 Skin Corrosion.

6. 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.oecd1.org/ehs/test/background.htm).

7. 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.oecd1.org/ehs/Class/HCL6.htm).

▼B

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.oecd1.org/ehs/test/ monos. htm).

9. EPA (1990), Atlas of Dermal Lesions, *(20T-2004)*. United States Environmental Protection Agency, Office of Pesticides and Toxic Substances, Washington, DC, August 1990.

(Available from OECD Secretariat upon request.)

▼B

Tabell 1

GRADERING AV HUDREAKTIONER

Rodnad och sårskorpebildning

Ingen rodnad	0
Mycket svag rodnad (knappt skönjbart)	1
Väldefinierad rodnad	2
Moderat till svår rodnad	3
Svår rodnad (köttrodnad) till sårskorpebildning som utgör hinder för gradering av rodnaden	4

Maximum: 4

Ödembildning

Inget ödem	0
Mycket svagt ödem (knappt skönjbart)	1
Milt ödem (området är väl avgränsat genom klar svullnad)	2
Moderat ödem (svullnadens höjd cirka 1 mm)	3
Svårt ödem (höjd över 1 mm och svullnaden sträcker sig utöver exponeringsområdet)	4

Maximum: 4

I fall av tvetydig respons kan en histopatologisk undersökning utföras i klargörande syfte.

▼B

Bilaga

Strategi för stegvis testning med avseende på hudirritation och hudkorrosion

ALLMÄNT

Även om denna strategi för stegvis testning inte ingår som en del av testmetod B.4, är den ett uttryck för det tillvägagångssätt som rekommenderas för bestämning av hudirriterande eller hudkorrosiva egenskaper. Detta tillvägagångssätt representerar både bästa praxis och etiska riktlinjer för *in vivo*-testning med avseende på hudirritation/hudkorrosion. Testmetoden utgör en vägledning för utförandet av *in vivo*-test och en sammanfattning av de faktorer som bör beaktas innan ett sådant test påbörjas. Strategin utgör ett tillvägagångssätt för utvärderingen av existerande data om olika testämnens egenskaper med avseende på hudirritation/hudkorrosion. Den utgör också ett stegvis förfarande för generering av relevanta data om ämnen för vilka det krävs ytterligare testning eller för ämnen som ännu inte har testats. Enligt strategin rekommenderas även validerade och godkända test *in vitro* eller *ex vivo* med avseende på hudkorrosion/hudirritation under specifika betingelser.

Med hänsyn till sund vetenskaplig praxis och djurens välbefinnande är det viktigt att undvika onödig användning av djur, och att minimera all testning som sannolikt framkallas allvarlig respons hos djuren. All information som är relevant för ämnets förmåga att framkalla hudkorrosion/hudirritation bör utvärderas innan man överväger *in vivo*-testning. Det kan eventuellt redan finnas tillräckliga bevis för att klassificera ett testämne med avseende på dess förmåga att framkalla hudkorrosion eller hudirritation, utan att för den skull behöva utföra testning på laboratoriedjur. När man använder en *weight-of-the-evidence*-analys och en strategi för stegvis testning minimeras behovet av *in vivo*-testning, särskilt för ämnen som sannolikt framkallar allvarliga reaktioner.

Det rekommenderas att en *weight-of-the-evidence*-analys används för att utvärdera existerande information om olika ämnens förmåga att framkalla hudirritation eller hudkorrosion för att avgöra om det behövs ytterligare testningar, andra än hudtestningar *in vivo,* som hjälp för att karakterisera en sådan egenskap. I fall där ytterligare undersökningar behövs, rekommenderas strategin för stegvis testning när det gäller att generera relevanta försöksdata. För ämnen som inte har testats tidigare bör strategin för stegvis testning användas för att generera de data som behövs för att utvärdera ämnets förmåga att framkalla hudkorrosion eller hudirritation. Den testningsstrategi som beskrivs i denna bilaga har utarbetats inom ramen för en OECD-arbetsgrupp (1). Strategin bekräftades och utvidgades senare i *Harmonised Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances,* i den form det godkändes vid 28th *Joint Meeting ofthe Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals,* i november 1998 (2).

BESKRIVNING AV UTVÄRDERINGS- OCH TESTNINGSSTRATEGIN

Innan testning utförs som en del av strategin för stegvis testning (se schemat), bör all tillgänglig information utvärderas i syfte att fastställa behovet av *in* vivo-testning. Trots att signifikant information kan fås genom utvärdering av enskilda parametrar (till exempel extrema pH-värden), bör den tillgängliga informationen utvärderas som en helhet. Alla relevanta data om det berörda ämnets (eller analoga ämnens) verkningar bör utvärderas genom beslut som grundas på en *weight-of-the*-evidence-analys, och en motivering för beslutet bör anges. Huvudvikten bör läggas vid existerande data om ämnet (både i fråga om människor och djur). Därefter följer resultatet av testning *in vitro* eller *ex vivo. In vivo*-testning av korrosiva ämnen bör alltid undvikas när det är möjligt. Till de faktorer som bör beaktas inom ramen för testningsstrategin hör följande:

▼B

Utvärdering av existerande data rörande människor och djur (steg 1). Existerande data rörande människor, till exempel kliniska undersökningar eller undersökningar inom arbetslivet och fallstuder och/eller data om testning på djur, såsom data från toxicitetsundersökningar med enstaka eller upprepadhudexponering, bör beaktas först, eftersom de ger tillgång till information som direkt hör samman med verkningarna på huden. Ämnen med kända irriterande eller korrosiva egenskaper, samt ämnen med klara bevis om att de inte har sådana egenskaper, behöver inte testas *in vivo.*

Analys av strukturaktivitetssamband (SAR) (steg 2). I mån av tillgänglighet bör resultaten från testning av strukturellt närbesläktade ämnen beaktas. Om det finns tillgång till data rörande människa och/eller djur för strukturellt närbesläktade ämnen eller blandningar av sådana ämnen, och dessa data är tillräckliga för att indikera att dessa ämnen har förmåga att framkalla hudkorrosion/hudirritation, kan man anta att det ämne som utvärderas kommer att framkalla samma respons. I sådana fall behöver ämnet eventuellt inte testas. Negativa data från undersökningar med strukturellt närbesläktade ämnen eller blandningar av sådana ämnen utgör inte, inom ramen för strategin för stegvis testning, tillräckliga bevis på att ett ämne inte skulle ha korrosiva eller irriterande egenskaper. Validerade och godkända metoder för bestämning av strukturaktivitetssamband bör användas för att identifiera förmågan att framkalla hudkorrosion och hudirritation.

Fysikalkemiska egenskaper och kemisk reaktivitet (steg 3). Ämnen med extrema pH-värden, till exempel $\leq 2{,}0$ eller $\geq 11{,}5$ kan ha kraftiga lokala verkningar. Om ett extremt pH-värde används som grund för att konstatera att ett ämne är korrosivt eller irriterande för huden, behöver eventuellt också ämnets syra/basreserv (buffertkapacitet) beaktas (3), (4). Om buffertkapaciteten tyder på att ämnet eventuellt inte är korrosivt för huden, bör ytterligare testning utföras för att bekräfta detta. Härvid bör man helst använda validerade och godkända *in vitro*- eller *ex vivo*-tester (se stegen 5 och 6).

Toxicitet för huden (steg 4). Om ett ämne har konstaterats vara mycket toxiskt när det tillförs via huden, kan en *in vivo*-undersökning med avseende på hudirritation/hudkorrosion eventuellt inte utföras på grund av att den normalt applicerade mängden testämne skulle överskrida den mycket toxiska dosen, vilket skulle leda till att djuren dör eller utsätts för svårt lidande. Om dessutom undersökningar med avseende på toxicitet för huden har gjorts på albinokanin med doser upp till gränsnivån på 2 000 mg/kg kroppsvikt eller högre, och ingen hudirritation eller hudkorrosion har observerats, behövs sannolikt ingen ytterligare testning för hudirritation eller hudkorrosion. Ett antal faktorer bör beaktas vid utvärderingen av resultaten från tidigare utförda undersökningar med avseende på akut toxicitet för huden. Som exempel kan nämnas att den rapporterade informationen om hudskador kan vara ofullständig. Testningen och observationerna kan ha gjorts på en annan art än kanin, och arterna kan vara mycket olika när det gäller responskänsligheten. Testämnet kan också ha applicerats på djuren i en form som inte är lämplig när det gäller bedömning av hudirritation/hudkorrosion, till exempel utspädda ämnen för testning av toxicitet för huden (5). I fall där välplanerade och välutförda undersökningar med avseende på toxicitet för huden har gjorts på kanin, kan dock negativa fynd anses vara tillräckligt bevis på att ämnet i fråga inte är korrosivt eller irriterande.

Resultat från in vitro- eller ex vivo-test (steg 5 och 6). Ämnen som har uppvisat korrosiva eller starkt irriterande egenskaper i ett validerat och godkänt test *in vitro eller ex vivo* (6), (7) avsett för utvärdering av dessa specifika verkningar, behöver inte testas på djur. Man kan anta att sådana ämnen framkallar liknande allvarliga verkningar *in vivo.*

▼B

In vivo-test på kanin (steg 7 och 8). Om ett beslut grundat på en *weight-of the-evidence*-analys fattats för *in vivo*-testning, bör man börja med ett inledande test där ett enskilt djur används. Om resultatet av ett sådant test tyder på att ämnet framkallar korrosion på huden, bör ingen ytterligare testning utföras. Om ingen korrosion observeras vid det inledande testet bör irritationsrespons eller negativ respons bekräftas med hjälp av ytterligare två djur och en exponeringsperiod på fyra timmar. Om irritation har observerats vid det inledande testet, kan bekräftelsetestet göras enligt den stegvisa principen eller genom samtidig exponering på ytterligare två djur.

HÄNVISNINGAR

1. OECD (1996), ”Test Guidelines Programme: Final Report on the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods”, Solna, Sverige, den 22–24 januari 1996 (http://www1.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://www1.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm).

3. A.P. Worth, J.H. Fentem, M. Balls, P.A. Botham, R.D. Curren, L.K. Earl, J. Esdaile, M. Liebsch (1998), ”An Evaluation of the Proposed OECD Testing Strategy for Skin Corrosion”, *ATLA*. 26, 709–720.

4. J.R. Young, M.J. How, A.P. Walker, W.M.H.Worth (1988), ”Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substances, Without Testing on Animals”, *Toxic In Vitro, 2* (1) 19–26.

5. S.M. Patil, E. Patrick, H.I. Maibach (1996), ”Animal, Human, and In Vitro Test Methods for Predicting Skin Irritation”, Francis N. Marzulli och Howard I. Maibach (red.), *Dermatotoxicology,* femte utgåvan ISBN 1-56032-356-6, kapitel 31, 411–436.

6. Testmetod B.40.

7. J.H. Fentem, G.E.B. Archer, M. Balls, P.A. Botham, R.D. Curren, L.K. Earl, D.J. Esdaile, H.G. Holzhutter och M. Liebsch (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.

▼B

Schema

TESTNINGS- OCH UTVÄRDERINGSSTRATEGI FÖR HUDIRRITATION/HUDKORROSION

	Activity	Finding	Conclusion
1	Existing human and/or animal data showing effects on skin or mucous membranes	Corrosive	Apical endpoint; considered corrosive. No testing is needed.
		Irritating	Apical endpoint; considered to be an irritant. No testing is needed.
		Not corrosive/not irritating	Apical endpoint; considered not corrosive or irritating. No testing required.
	↓ *No information available, or available information is not conclusive*		
2	Perform SAR evaluation for skin corrosion/irritation	Predict severe damage to skin	Considered corrosive. No testing is needed.
		Predict irritation to skin	Considered an irritant. No testing is needed.
	↓ *No predictions can be made, or predictions are not conclusive or negative*		
3	Measure pH (consider buffering capacity, if relevant)	pH ≤ 2 or ≥ 11.5 (with high buffering capacity, if relevant)	Assume corrosivity. No testing is needed.
	↓ *2 < pH < 11.5, or pH ≤ 2.0 or ≥ 11.5 with low/no buffering capacity, if relevant*		
4	Evaluate systemic toxicity data via dermal route (1)	Very toxic	No further testing is needed.
		Not corrosive or irritating when tested to limit dose of 2000 mg/kg body weight or higher, using rabbits	Assume not corrosive or irritating. No further testing is needed.
	↓ *Such information is not available or is non-conclusive*		
5	Perform validated and accepted *in vitro* or *ex vivo* test for skin corrosion	Corrosive response	Assume corrosivity *in vivo*. No further testing is needed.
	↓ *Substance is not corrosive*		
6	Perform validated and accepted *in vitro* or *ex vivo* test for skin irritation	Irritant response	Assume irritancy *in vivo*. No further testing is needed.
	↓ *Validated in vitro or ex vivo testing methods for skin irritation are not yet available or substance is not an irritant*		
7	Perform initial *in vivo* rabbit test using one animal	Severe damage to skin	Considered corrosive. No further testing is needed.
	↓ *No severe damage*		
8	Perform confirmatory test using one or two additional animals	Corrosive or irritating	Considered corrosive or irritating. No further testing is needed
		Not corrosive or irritating	Considered not corrosive or irritating. No further testing needed

(1) can be considered before Steps 2 and 3.

▼M7

B.5 AKUT ÖGONIRRITATION/ÖGONKORROSION

INLEDNING

Denna testmetod motsvarar OECD:s testriktlinje (TG) 405 (2012). OECD:s riktlinjer för kemikalietestning ses över med jämna mellanrum för att säkerställa att de återspeglar bästa tillgängliga vetenskap. Vid tidigare revideringar av denna testriktlinje lades särskilt stor vikt vid möjligheterna till bättre testningsförfaranden, där djurskyddsfrågor beaktas så väl som möjligt. Sådana förfaranden innebär att all existerande information om testkemikalien utvärderas i syfte att undvika onödiga djurförsök. TG 405 (antagen 1981 och uppdaterad 1987, 2002 och 2012) innehåller en rekommendation om att laboratoriet, innan det beskrivna in vivo-testet för akut ögonkorrosion/ögonirritation inleds, bör göra en weight-of-the-evidence-analys (1) av existerande relevanta data. Om de data som finns att tillgå inte är tillräckliga bör behövliga data genereras med hjälp av stegvis testning (2) (3). Den rekommenderade testningsstrategin inbegriper validerade och godkända in vitro-test och anges i ett tillägg till denna testmetod. För tillämpningen av förordning (EG) nr 1907/2006 om registrering, utvärdering, godkännande och begränsning av kemikalier (Reach) ([1]), ingår även en integrerad teststrategi i Echas relevanta vägledning (21). Testning på djur bör endast utföras om det bedöms vara nödvändigt efter övervägande av tillgängliga alternativa metoder och efter användning av de metoder som bedömts vara lämpliga. Vid tidpunkten för utarbetandet av denna uppdaterade testmetod var användningen av testmetoden fortfarande nödvändig i vissa fall eller krävdes enligt vissa regelverk.

Den senaste uppdateringen inriktas främst på användningen av smärtstillande medel och bedövningsmedel och påverkar inte testriktlinjens grundläggande princip och struktur. ICCVAM ([2]) och en oberoende internationell vetenskaplig expertpanel har granskat användbarhet och begränsningar när det gäller rutinmässig användning av lokalbedövningsmedel, systemiska smärtstillande medel och humana endpoints för säkerhetstester i fråga om ögonirritation (12). Granskningen visade att nästan all eller hela smärtan och lidandet kan undvikas med hjälp av lokalbedövningsmedel och systemiska smärtstillande medel utan att testet påverkas och ledde till rekommendationen att dessa ämnen alltid ska användas. Granskningen har beaktats i denna testmetod. Lokalbedövningsmedel, systemiska smärtstillande medel och humana endpoints bör användas rutinmässigt vid in vivo-testning med avseende på ögonirritation/ögonkorrosion. Undantag från användning bör motiveras. De förbättringar som beskrivs i denna metod kommer att bidra till att avsevärt minska eller undvika smärta och lidande hos djuren i de flesta testningssituationer där in vivo-testning fortfarande är nödvändig för att avgöra om ett ämne är säkert för ögonen.

Balanserande förebyggande smärtlindring bör omfatta i) rutinmässig förbehandling med lokalbedövningsmedel (t.ex. proparakain eller tetrakain) och ett systemiskt smärtstillande medel (t.ex. buprenorfin), ii) ett rutinmässigt efterbehandlingsschema med systemiska smärtstillande medel (t.ex. buprenorfin och meloxikam), iii) schemalagd observation, övervakning och registrering av djuren för kliniska tecken på smärta och/eller lidande och iv) schemalagd observation, övervakning och registrering av arten, svårighetsgraden och utvecklingen av alla ögonskador. Närmare uppgifter ges i de uppdaterade förfaranden som beskrivs nedan. När testkemikalien har applicerats bör inga ytterligare lokalbedövningsmedel eller smärtstillande medel användas för att undvika störningar i

([1]) Europaparlamentets och rådets förordning (EG) nr 1907/2006 av den 18 december 2006 om registrering, utvärdering, godkännande och begränsning av kemikalier (Reach), inrättande av en europeisk kemikaliemyndighet, ändring av direktiv 1999/45/EG och upphävande av rådets förordning (EEG) nr 793/93 och kommissionens förordning (EG) nr 1488/94 samt rådets direktiv 76/769/EEG och kommissionens direktiv 91/155/EEG, 93/67/EEG, 93/105/EG och 2000/21/EG. EUT L 304, 22.11.2007, s. 1.

([2]) USA:s Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods

▼M7

undersökningen. Smärtstillande medel med antiinflammatorisk verkan (t.ex. meloxikam) bör inte appliceras lokalt och doser som används systematiskt får inte påverka effekterna på ögonen.

Definitionerna anges i tillägget för testmetoden.

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN

Med hänsyn till sund vetenskaplig praxis och djurens välbefinnande bör in vivo-testning inte genomföras förrän alla tillgängliga data som är relevanta för kemikaliens förmåga att framkalla hudkorrosion/hudirritation har utvärderats genom en weight-of-the-evidence-analys. Sådana data utgör belägg från befintliga undersökningar på människor och/eller försöksdjur, belägg för ögonkorrosion/ögonirritation i fråga om ett eller flera strukturellt besläktade ämnen eller blandningar av sådana ämnen, data som visar att ämnet är starkt surt eller alkaliskt (4), (5) samt resultat från validerade och godkända in vitro- eller ex vivo-tester med avseende på hudkorrosion och ögonkorrosion/ögonirritation (6) (13) (14) (15) (16) (17). Sådana undersökningar kan ha gjorts före, eller som ett resultat av, en weight-of-the-evidence-analys.

För vissa ämnen kan en sådan analys visa att det behövs in vivo-testning av kemikaliens förmåga att framkalla ögonkorrosion/ögonirritation. I alla sådana fall bör man, innan ett in vivo-ögontest övervägs, helst göra ett in vivo- eller in vitro-test för utvärdering av kemikaliens verkningar på huden och utvärdera testet enligt den stegvisa testningsstrategin i testmetod B.4 (7) eller den integrerade testningsstrategi som beskrivs i Echas vägledning (21).

En rekommenderad strategi för stegvis testning, som inbegriper validerade och godkända in vitro- eller ex vivo-test med avseende på ögonkorrosion/ögonirritation finns som tillägg till denna metod, och när det gäller Reach i Echas vägledning (21). En sådan testningsstrategi bör tillämpas innan in vivo-tester utförs. För nya kemikalier rekommenderas ett stegvis testningsförfarande för generering av vetenskapligt sunda data om en kemikalies förmåga att framkalla korrosion/irritation. För befintliga kemikalier med otillräckliga data om korrosion/irritation för hud och ögon kan strategin användas för att fylla upp luckor i tillgängliga data. Om en annan testningsstrategi eller ett annat förfarande används, eller om man beslutar att inte använda ett förfarande med stegvis testning, bör detta motiveras.

PRINCIP FÖR IN VIVO-TEST

Efter förbehandling med ett systemiskt smärtstillande medel och lämplig lokalbedövning appliceras testkemikalien som en engångsdos i försöksdjurets ena öga. Det obehandlade ögat används som referens. Graden av ögonirritation eller ögonkorrosion utvärderas genom klassificering av skadorna på ögats bindhinna (konjunktiva), hornhinnan och iris med specifika intervall. Likaså bör övriga verkningar i ögat och skadliga systemiska verkningar beskrivas för att en fullständig utvärdering av verkningarna ska fås. Testet bör pågå tillräckligt länge för att ge möjlighet att utvärdera om de observerade verkningarna är reversibla eller irreversibla.

Djur som uppvisar ihållande tecken på allvarligt lidande och/eller smärta i något skede av testningen eller skador som överensstämmer med de humana endpoints som beskrivs i denna testmetod (se punkt 26) bör avlivas på ett skonsamt sätt, och detta bör beaktas vid utvärderingen av kemikalien. Kriterier för att fatta beslut om skonsam avlivning av döende eller allvarligt lidande djur finns i ett OECD-vägledningsdokument (8).

▼M7

FÖRBEREDELSER FÖR IN VIVO-TEST

Val av art

Rekommenderat försöksdjur är albinokanin. Friska, unga vuxna exemplar bör användas. Om andra arter eller stammar används bör detta motiveras.

Förberedelse av djuren

De djur som preliminärt har valts ut för testning bör undersökas med avseende på båda ögonen inom 24 timmar före testets början. Djur som har irriterade ögon, okulära defekter eller existerande skada på hornhinnan bör inte användas.

Inhysnings- och utfodringsförhållanden

Djuren ska inhysas individuellt. Temperaturen i försöksdjurens utrymmen bör vara 20 °C (± 3 °C) för kaniner. Den relativa fuktigheten bör vara minst 30 % och helst inte överstiga 70 %, utom när rummet rengörs då målet bör vara 50–60 %. Artificiell belysning bör användas, med en dygnsrytm på 12 timmar ljus och 12 timmar mörker. Överdriven ljusintensitet bör undvikas. Konventionellt laboratoriefoder kan användas för utfodringen, och djuren bör ha obegränsad tillgång till dricksvatten.

TESTFÖRFARANDE

Användning av lokalbedövningsmedel och systemiska smärtstillande medel

Följande förfaranden rekommenderas för att undvika eller minimera smärta och lidande i testningsförfaranden för att avgöra om ett ämne är säkert för ögonen. Alternativa förfaranden som har visat sig fungera lika bra för att undvika eller lindra smärta och lidande kan användas.

— Sextio minuter innan testkemikalien appliceras ges buprenorfin 0,01 mg/kg genom subkutan injektion (SI) för som smärtstillande behandling. Buprenorfin och andra liknande opioida smärtstillande medel som ges systematiskt är inte kända för att, och förväntas inte, medföra några ändringar av ögats respons (12).

— Fem minuter före appliceringen av testkemikalien appliceras en eller två droppar av ett lokalt oftalmologiskt bedövningsmedel (t.ex. 0,5 % proparakainhydroklorid eller 0,5 % tetrakainhydroklorid) i varje öga. För att undvika eventuella störningar av undersökningen rekommenderas lokalbedövningsmedel som inte innehåller konserveringsmedel. Det öga som inte behandlas med testkemikalien utan med lokalbedövningsmedel används som referens. Om testkemikalien förväntas orsaka betydande smärta och lidande ska det normalt inte testas in vivo. Vid tvivel eller om testning är nödvändig bör man dock överväga ytterligare applicering av lokalbedövningsmedel i femminutersintervaller innan testkemikalien appliceras. Användarna bör vara medvetna om att flera appliceringar av lokalbedövningsmedel kan orsaka en liten ökning av svårighetsgraden och/eller den tid det tar innan kemiskt framkallade skador blir tydliga.

— Åtta timmar efter appliceringen av testkemikalien ges buprenorfin 0,01 mg/kg SI och meloxikam 0,5 mg/kg SI som kontinuerlig smärtstillande behandling. Även om det inte finns några uppgifter som tyder på att meloxikam har en antiinflammatorisk verkan på ögat när det ges genom subkutan injektion en gång om dagen bör det inte ges förrän minst åtta timmar efter det att testkemikalien har applicerats för att undvika eventuella störningar av undersökningen (12).

— När det har gått åtta timmar efter appliceringen av testkemikalien bör buprenorfin 0,01 mg/kg ges genom subkutan injektion var tolfte timme kombinerat med meloxikam 0,5 mg/kg SI var 24:e timme till dess att ögonskadorna läker och det inte finns kliniska tecken på smärta och lidande. Det

▼M7

finns långtidsverkande beredningar av smärtstillande medel som kan övervägas för att minska doseringen av sådana medel.

— Akut smärtlindring bör ges omedelbart efter appliceringen av testkemikalien om förebyggande smärtlindring och lokalbedövning inte är tillräcklig. Om djuret visar tecken på smärta och lidande under undersökningen bör en ”akutdos” av buprenorfin 0,03 mg/kg omedelbart ges genom subkutan injektion och upprepas vid behov så ofta som var åttonde timme i stället för 0,01 mg/kg SI var tolfte timme. Meloxikam 0,5 mg/kg ges då genom subkutan injektion var 24:e timme tillsammans med akutdosen av buprenorfin, men inte förrän minst åtta timmar efter appliceringen av testkemikalien.

Applicering av testkemikalien

Testkemikalien tillförs i ena ögats konjunktivasäck (alla djur). Före tillförseln bör det undre ögonlocket varsamt dras ut en bit ut från ögongloben. Ögonlocken förs därefter samman i cirka en sekund för att förhindra att ämnet kommer ut. Det andra, obehandlade ögat används som referens.

Sköljning

Försöksdjurens ögon bör inte sköljas under minst 24 efter tillförseln av testkemikalien, utom när det gäller fasta ämnen (se punkt 18) eller om det uppstår omedelbara korrosiva eller irriterande verkningar. Efter 24 timmar kan ögonen sköljas, om detta bedöms vara lämpligt.

Användningen av en satellitgrupp för att undersöka inverkan av sköljningen rekommenderas inte, utom om det är vetenskapligt motiverat. Om en satellitgrupp används, ska den bestå av två kaniner. Sköljningsbetingelserna bör dokumenteras omsorgsfullt, t.ex. sköljningstidpunkten, lösningens sammansättning och temperatur samt sköljningstiden, applicerad volym och sköljningsintensitet.

Dosnivå

(1) Testning av vätskor

Vid testning av vätskor används en dos på 0,1 ml. Pumpsprej bör inte användas för att tillföra kemikalien direkt i ögat. I stället bör vätskan sprejas in i en behållare, som används för att tillföra 0,1 ml i ögat.

(2) Testning av fasta ämnen

Vid testning av fasta ämnen, pastor och kemikalier i partikelform, bör den tillförda mängden ha en volym på 0.1 ml eller en medelvikt på högst 100 mg. Testkemikalien bör malas ned till fint stoft. Det fasta materialets volym bör mätas efter en varsam kompaktering, som görs till exempel genom att knacka på mätbehållaren. Om en fast testkemikalie inte har tagits bort ur försöksdjurets öga med hjälp av fysiologiska mekanismer vid den första observationstidpunkten (en timme efter behandlingen), kan ögat sköljas med saltlösning eller destillerat vatten.

(3) Testning av aerosoler

Det rekommenderas att material i form av pumpsprej eller aerosol sprejas i en behållare, som sedan används för tillförsel i ögat. Det enda undantaget är kemikalier i aerosoler i tryckbehållare som inte går att samla in på grund av förångning. I sådana fall hålls djurets öga öppet och testkemikalien sprutas in i ögat under cirka en sekund, på cirka 10 cm avstånd direkt framför ögat. Avståndet kan variera beroende på behållarens tryck och innehåll. Det är viktigt att se till att ögat inte skadas av sprejtrycket. I tillämpliga fall kan det vara nödvändigt att utvärdera om sprejstyrkan kan framkalla ”mekanisk” skada i ögat.

▼M7

En uppskattning av dosen från en aerosol kan göras genom en simulering på följande sätt: Ämnet sprejas på ett vägningspapper genom en öppning som har storleken av ett kaninöga och som hålls strax framför papperet. Papperets viktökning används som grund för att uppskatta den mängd som har sprejats i ögat. För flyktiga kemikalier kan dosen uppskattas genom att väga en mottagningsbehållare före och efter borttagning av testkemikalien.

Preliminärt test (in vivo-test avseende ögonirritation/ögonkorrosion på ett enskilt djur)

Det rekommenderas starkt att in vivo-testet först görs på ett enskilt djur (se tillägget till denna testmetod: Strategi för stegvis testning med avseende på ögonirritation och ögonkorrosion Observationer bör göra det möjligt att bestämma svårhetsgrad och reversibilitet innan man går vidare till ett bekräftande test på ett andra djur.

Om resultatet av ett sådant test tyder på att kemikalien är korrosiv eller framkallar kraftig irritation i ögat när man använder det beskrivna förfarandet, bör ingen ytterligare testning utföras.

Bekräftande test (in vivo-test avseende ögonirritation med ytterligare djur)

Om ingen korrosiv verkan eller kraftig irritation observeras vid det preliminära testet, bör responsen (irriterande eller negativ) bekräftas med hjälp av högst två ytterligare djur. Om en kraftig irritation har observerats vid det preliminära testet rekommenderas bekräftande test som görs stegvis på ett djur i taget, i stället för samtidigt test på båda tilläggsdjuren. Om frätning eller kraftig irritation kan observeras på det tilläggsdjur som först används, bör testningen avbrytas. Om resultaten från testet på det andra djuret är tillräckliga för att fastställa en faroklassificering bör inga fler tester utföras.

Observationsperiod

Observationsperioden bör vara tillräckligt lång för att det till fullo ska gå att utvärdera omfattningen och reversibiliteten hos de observerade verkningarna. Försöket bör dock avslutas omedelbart, oavsett hur länge det pågått, om det berörda djuret uppvisar tecken på svåra smärtor eller lidande (8). För fastställandet av verkningarnas reversibilitet bör djuren i regel observeras i 21 dagar efter tillförsel av testkemikalien. Om reversibilitet kan observeras innan 21 dagar har gått kan försöket omedelbart avslutas.

Kliniska observationer och gradering av ögonreaktionerna

Ögonen bör utvärderas noggrant för att bekräfta förekomst eller frånvaro av ögonskador en timme efter appliceringen av testkemikalien, följt av minst dagliga utvärderingar. Försöksdjuren bör bedömas flera gånger dagligen under de första tre dagarna så att beslut om upphörande av testet fattas i rätt tid. Djuren bör utvärderas rutinmässigt under hela undersökningen när det gäller kliniska tecken på smärta och/eller lidande (t.ex. upprepat krafsande eller gnuggande i ögat, överdrivna blinkningar, överdriven tårbildning) (9) (10) (11), minst två gånger om dagen med minst sex timmar mellan observationerna, eller oftare om så krävs. Detta är nödvändigt för att i) utvärdera djuren på lämpligt sätt för att upptäcka tecken på smärta och lidande och utifrån detta fatta välgrundade beslut om behovet av att öka dosen av smärtstillande medel, och ii) utvärdera djuren för bevis för etablerade humana endpoints för att fatta välgrundade beslut om human avlivning av djuren och säkerställa att sådana beslut fattas i rätt tid. Fluoresceinfärgning bör användas rutinmässigt och spaltlampa bör användas om det anses lämpligt (t.ex. för att bedöma skadans djup vid förekomst av ulceration av kornea) och som ett hjälpmedel för att upptäcka och mäta ögonskador och utvärdera om de fastställda endpointkriterierna för human avlivning är uppfyllda.

▼M7

Digitala fotografier av observerade skador kan samlas in som referensmaterial och för permanent registrering av ögonskadornas omfattning. Djuren bör inte utsättas för testning längre än det är nödvändigt för att få definitiv information. Djur som uppvisar allvarliga tecken på smärta eller lidande bör omedelbart avlivas på ett skonsamt sätt, och detta bör beaktas vid utvärderingen av kemikalien.

Djur som fått följande ögonskador efter tillförsel av kemikalien bör avlivas på ett humant sätt (skadegraderna beskrivs i tabell 1): perforering eller signifikant ulceration av kornea inklusive stafylom, blod i främre ögonkammaren, korneaopacitet av grad 4, ingen ljusreaktion (irisreaktion av grad 2) som varar i 72 timmar, ulceration av konjunktivamembran, nekros i konjunktiva- eller blinkhinna eller bildning av sårskorpa. Skälet till avlivningen är att dessa skador i regel är irreversibla. Vidare rekommenderas att följande ögonskador används som humana endpoints för beslut om att avsluta undersökningen före den planerade observationsperioden på 21 dagar. Följande skador anses tyda på allvarliga irritations- eller korrosionsskador och skador som inte förväntas gå tillbaka helt i slutet av observationsperioden på 21 dagar: mycket djupa skador (t.ex. ulceration av kornea som går djupare än ytlagren av stroma), förstörd limbus > 50 %, vilket visar sig i form av blekning av bindhinnevävnaden) och allvarlig ögoninfektion (varutsöndring). En kombination av vaskulering av hornhinnans yta (dvs. pannus), fluoresceinfärgade områden som inte minskar över tiden enligt dagliga utvärderingar och/eller brist på nybildning av epitel fem dagar efter appliceringen av testkemikalien kan också betraktas som eventuellt användbara kriterier för att motivera det kliniska beslutet att avsluta undersökningen i förtid. Dessa resultat är dock individuellt sett inte tillräckliga för att motivera att undersökningen avslutas i förtid. Om allvarliga okulära effekter identifieras bör en behandlande veterinär eller en kvalificerad laboratorieveterinär som är utbildad i att identifiera kliniska skador konsulteras för en klinisk undersökning i syfte att avgöra om kombinationen av dessa effekter motiverar att undersökningen avslutas i förtid. Graderna av okulär reaktion (konjunktiva, kornea och iris) bör fastställas och registreras 1, 24, 48 och 72 timmar efter appliceringen av kemikalien (tabell 1). Djur som inte utvecklar okulära skador ska inte avlivas förrän det har gått tre dagar från tillförsel av ämnet. Djur med okulära skador som inte är allvarliga bör observeras tills skadorna läks, eller under 21 dagar. Efter det avslutas undersökningen. Observationer bör göras och registreras efter minst 1, 24, 48 och 72 timmar samt efter 7, 14 och 21 dagar i syfte att fastställa skadornas status och huruvida de är reversibla eller inte. Tätare observationer bör göras om det är nödvändigt för att avgöra om försöksdjuren bör avlivas av humana skäl eller avlägsnas från undersökningen på grund av negativa resultat.

Graderna av okulära skador (tabell 1) bör registreras vid varje undersökning av djuren. Likaså bör alla andra ögonskador (t.ex. pannus, missfärgning, förändringar i främre ögonkammaren) eller skadliga systemiska verkningar även rapporteras.

Som hjälpmedel vid undersökningen av reaktionerna kan användas en binokulärlupp, ficklampa, biomikroskop eller annan lämplig utrustning. Efter det att observationerna har registrerats vid 24 timmar efter tillförseln, kan ögonen undersökas ytterligare med hjälp av fluorescein.

Graderingen av okulär respons är oundgängligen subjektiv. För att främja en tillnärmning av graderingen av okulär respons, och som stöd för testningslaboratorier och alla som är med om att utföra och tolka observationer, bör den personal som gör observationsarbetet få tillbörlig utbildning om klassificeringssystemet.

▼M7

DATA OCH RAPPORTERING

Utvärdering av resultaten

Klassificeringen av okulär respons bör göras med hänsyn till skadornas natur och allvarlighetsgrad samt deras reversibilitet eller irreversibilitet. Individuella klassificeringsresultat representerar ingen absolut standard för en kemikalies förmåga att framkalla irritation, eftersom även andra verkningar av testkemikalien utvärderas. Enskilda klassificeringsresultat bör i stället ses som referensvärden, och de är meningsfulla endast när de åtföljs av en fullständig beskrivning och utvärdering av alla observationer.

Testrapport

Testrapporten ska innehålla följande information:

Motivering för in vivo-testning: weight-of-evidence-analys av tidigare befintliga data, inbegripet resultat från ett förfarande enligt strategin för stegvis testning, enligt följande:

— Beskrivning av relevanta data som erhållits före testningen.

— Data som erhållits vid de olika stegen enligt testningsstrategin.

— Beskrivning av utförda in vitro-test, inbegripet detaljerade uppgifter om förfaranden och resultat som erhållits med test- och referenskemikalier.

— Beskrivning av utförda in vivo-test med avseende på hudirritation/hudkorrosion, inbegripet de resultat som erhållits.

— Weight-of-the-evidence-analys för utförandet av in vivo-test.

Testkemikalie:

— Identifieringsdata (t.ex. kemisk beteckning och CAS-nummer om detta är känt, renhet, kända föroreningar, källa, satsnummer).

— Fysikalisk natur och fysikalisk-kemiska egenskaper (till exempel pH, flyktighet, löslighet, stabilitet, reaktivitet med vatten).

— Om det rör sig om en blandning bör beståndsdelarna identifieras, inklusive identifieringsdata om ingående ämnen (t.ex. kemiska beteckningar och CAS-nummer om detta är känt) samt deras koncentrationer.

— Dos.

Vehikel:

— Identifieringsdata, koncentration (om tillämpligt), volym som har använts.

— Motivering för val av vehikel.

Försöksdjur:

— Art och stam som har använts, motivering om albinokanin inte har använts.

— Djurens ålder, enskilt för varje djur vid testets start.

— Antalet djur per kön i test- och kontrollgrupperna (vid behov).

— De enskilda djurens vikt vid testets start och slut.

— Ursprung, inhysning, foder etc.

▼M7

Bedövning och smärtstillande medel

— Doser och tidpunkter när topisk/lokal bedövning och systemiska smärtstillande medel gavs.

— Om topisk/lokal bedövning används, anges identifieringsdata, renhet, typ och potentiell växelverkan med testkemikalien.

Resultat:

— Beskrivning av den metod som har använts för att klassificera irritationen vid varje observationstidpunkt (till exempel ficklampa, biomikroskop, fluorescein).

— En sammanställning i tabellform av responsdata rörande irritation/korrosion för varje djur vid varje observationstidpunkt fram till dess att testningen avslutas för det djurets del.

— Narrativ beskrivning av graden och naturen hos den irritation eller korrosion som har observerats.

— Beskrivning av alla andra eventuella ögonskador som har observerats (till exempel vaskularisering, pannusbildning, adhesioner, missfärgning).

— Beskrivning av icke-okulära lokala och systemiska skadliga verkningar, register över kliniska tecken på smärta och lidande, digitala fotografier och, i förekommande fall, histopatologiska fynd.

Diskussion av resultaten.

Tolkning av resultaten.

En extrapolering av resultaten från undersökningar av ögonirritation som gjorts på försöksdjur är valid endast till en begränsad utsträckning. I många fall är albinokaniner mycket känsligare än människor i fråga om ämnen som är irriterande eller korrosiva för ögat.

Särskild noggrannhet bör iakttas vid tolkning av resultaten i syfte att utesluta irritation som beror på en sekundär infektion.

LITTERATUR

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

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

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

(4) Young, J.R., m.fl. (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., m.fl. (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 denna bilaga, *Akut hudirritation/hudkorrosion*.

▼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 E.M., Marcella K.L., Woodson J.F. (1985), Animal pain: evaluation and control, Lab Animal, May/June, 20–36.

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

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

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

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

(13) Kapitel B.40 i denna bilaga, *in vitro-test av hudkorrosivitet:* Bestämning av transkutant elektriskt motstånd (TER).

(14) Kapitel B.40a i denna bilaga, *in vitro-test av hudkorrosivitet:* Test med modell av human hud.

(15) OECD (2006), *Test nr 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 denna bilaga, *testmetoden BCOP (Bovine Corneal Opacity and Permeability) för identifiering av i) kemikalier som orsakar allvarlig ögonskada och ii) kemikalier för vilka det inte krävs klassificering för ögonirritation eller allvarlig ögonskada*.

(17) Kapitel B.48 i denna bilaga, testmetoden ICE (Isolated Chicken Eye Test) för identifiering av i) kemikalier som orsakar allvarlig ögonskada och ii) kemikalier för vilka det inte krävs klassificering för ögonirritation eller allvarlig ögonskada.

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

(19) FN (2011) Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), fjärde reviderade upplagan, New York och Genève: United Nations Publications.

(20) Europeiska kommissionen (2008), Europaparlamentets och rådets förordning (EG) nr 1272/2008 av den 16 december 2008 om klassificering, märkning och förpackning av ämnen och blandningar, ändring och upphävande av direktiven 2008/EEG och 67/548/EG samt ändring av förordning (EG) nr 1999/45. EUT L 353, s. 1.

(21) ECHA, Guidance on information requirements and chemical safety assessment, kapitel R.7a: Särskild vägledning om endpoints:

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

▼M7

Tabell 1

Gradering av okulära skador

Hornhinna (kornea)	Grad
Opacitet: graden av densitet (avläsningarna bör göras på området med den högsta densiteten) (*).	
Ingen ulceration eller opacitet.	0
Spridda eller diffusa områden med opacitet (annan än svag avmattning av den normala lystern), detaljer av iris klart synliga.	1
Enkelt skönjbart translucent område, detaljerna i iris är lätt förmörkade.	2
Pärlemorliknande område, inga detaljer i iris synliga, pupillens storlek kan knappt skönjas.	3
Opak hornhinna, iris kan inte skönjas genom opaciteten.	4
Maximum: 4	
Iris	
Normal	0
Märkbart fördjupade rugae, blodstockning, svullnad, måttlig hyperemi kring kornea eller injektion, iris reagerar för ljus (en långsam reaktion bedöms som en verkning).	1
Blödning, kraftig destruktion eller ingen reaktion på ljus.	2
Maximum: 2	
Konjunktiva	
Rodnad (hänför sig till palpebral och bulbär konjunktiva, exklusive hornhinnan och iris).	
Normal	0
Vissa blodkärl är hyperemiska (injekterade).	1
Diffus, blodröd färg, individuella blodkärl kan inte skönjas med lätthet.	2
Diffust köttröd.	3
Maximum: 3	
Chemos	
Svullnad (hänför sig till ögonlocken och/eller blinkhinnor)	
Normal	0
En viss svullnad över det normala.	1
Klar svullnad, delvis eversion av ögonlocken.	2
Svullnad, ögonlocken ungefär halvstängda.	3
Svullnad, ögonlocken mer än halvstängda.	4
Maximum: 4	

(*) Området för hornhinneopacitet bör noteras

▼M7

Tillägg

DEFINITIONER

Syra-/bas-reserven: För sura beredningar är detta den mängd (g) natriumhydroxid/100 g beredning som krävs för att producera ett specificerat pH. För alkaliska beredningar är det den mängd (g) natriumhydroxid som motsvarar den mängd svavelsyra (g)/100 g beredning som krävs för att producera ett specificerat pH (Young m.fl. (1988).

Kemikalie: ett ämne eller en blandning.

Icke-irriterande ämnen: ämnen som inte klassificeras som okulärt irriterande enligt EPA-kategorierna I, II eller III eller ögonirriterande enligt GHS-kategorierna 1, 2, 2A eller 2B eller EU-kategorierna 1 eller 2 (17) (18) (19).

Kemikalier som är frätande för ögonen: a) kemikalier som orsakar irreversibel vävnadsskada på ögat, b) kemikalier som klassificeras som ögonirriterande enligt GHS-kategori 1 eller enligt EPA-kategori I eller EU-kategori 1 (17) (18) (19).

Ögonirriterande kemikalier: a) kemikalier som orsakar en reversibel förändring i ögat, b) kemikalier som klassificeras som ögonirriterande enligt EPA-kategori II eller III eller GHS-kategorierna 2, 2A eller 2B eller CLP-kategori 2 (17) (18) (19).

Kraftigt ögonirriterande kemikalier: a) kemikalier som orsakar vävnadsskada i ögat som inte läker inom 21 dagar från appliceringen eller orsakar allvarlig synnedsättning, b) kemikalier som klassificeras som ögonirriterande enligt GHS-kategori 1 eller EPA-kategori I eller CLP-kategori 1 (17) (18) (19).

Testkemikalie: alla ämnen eller blandningar som testas med denna testmetod.

Stegvis metod: en strategi för stegvis testning där all befintlig information om en testkemikalie granskas i en angiven ordning, med användning av förfarandet med sammanvägd bedömning (weight of evidence) för att avgöra om det finns tillräckligt med information till hands för att besluta om faroklassificering innan man går vidare till nästa steg. Om testkemikaliens förmåga att framkalla irritation kan fastställas på grundval av befintlig information behövs ingen ytterligare testning. Om testkemikaliens förmåga att framkalla irritation inte kan fastställas på grundval av befintlig information genomförs ett stegvis sekventiellt djurförsöksförfarande tills att det går att fastställa en otvetydig klassificering.

Weight-of-the-evidence (process): Styrkor och svagheter hos en samling uppgifter som används som underlag för en slutsats som kanske inte framgår av de individuella uppgifterna.

▼M7

TILLÄGG TILL TESTMETOD B.5 [1]

STRATEGI FÖR STEGVIS TESTNING MED AVSEENDE PÅ ÖGONIRRITATION OCH ÖGONKORROSION

Allmänna överväganden

För en sund vetenskaplig praxis och för djurens välbefinnande är det viktigt att undvika onödig användning av djur, och minimera all testning som sannolikt framkallar allvarlig respons hos djuren. All information som är relevant för en kemikalies förmåga att framkalla ögonkorrosion/ögonirritation bör utvärderas innan in vivo-testning övervägs. Det kanske redan finns tillräckliga bevis för att klassificera en testkemikalie med avseende på dess förmåga att framkalla ögonkorrosion eller ögonirritation, utan behov av testning på laboratoriedjur. Man kan därför, genom att använda en weight-of-the-evidence-analys och följa strategin för stegvis testning, minimera behovet av in vivo-testning, särskilt i fråga om kemikalier som sannolikt framkallar allvarliga reaktioner.

Det rekommenderas att en weight-of-the-evidence-analys används för att utvärdera befintlig information om olika kemikaliers förmåga att framkalla ögonirritation eller ögonkorrosion. Därefter kan man avgöra om det behövs ytterligare undersökningar, andra än in vivo-test, som hjälp för att karakterisera sådan egenskap. I fall där ytterligare undersökningar behövs, rekommenderas ett förfarande enligt strategin för stegvis testning för att få fram relevanta försöksdata. För ämnen som inte har testats tidigare bör strategin för stegvis testning följas för att få fram de data som behövs för att utvärdera ämnets förmåga att framkalla ögonkorrosion eller ögonirritation. Den inledande testningsstrategi som beskrivs i detta tillägg har utarbetats inom ramen för en OECD-arbetsgrupp (1). Strategin bekräftades och utvidgades senare i *Harmonised Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances*, i den form systemet godkändes av vid det 28:e gemensamma mötet för kemikaliekommittén och kemikaliearbetsgruppen (Chemicals Committee och Working Party on Chemicals), i november 1998 (2) och uppdaterades av en OECD-expertgrupp 2011.

Även om denna testningsstrategi inte ingår som en del av testmetod B.5, är den ett uttryck för de rekommenderade principerna för bestämning av ett ämnes förmåga att framkalla ögonirritation eller ögonkorrosion. Dessa principer representerar både bästa praxis och etiska riktlinjer för in vivo-testning med avseende på ögonirritation/ögonkorrosion. Testmetoden är en vägledning för utförandet av test in vivo, och utgör en sammanfattning av de faktorer som bör beaktas innan ett sådant test övervägs. Inom ramen för strategin för stegvis testning används weight-of-the-evidence-analyser för utvärderingen av befintliga data om olika testkemikaliers egenskaper med avseende på ögonirritation/ögonkorrosion. Samtidigt fås tillgång till en stegvis metod för generering av relevanta data om kemikalier för vilka det krävs ytterligare testning eller för ämnen som ännu inte har testats. Enligt strategin utför man först validerade och godkända in vitro- eller ex vivo-tester och därefter görs undersökningar enligt TM B.4 under specifika omständigheter (3) (4).

Beskrivning av den stegvisa testningsstrategin

Innan testning utförs som en del av förfarandet enligt strategin för stegvis testning (se figuren), bör all tillgänglig information utvärderas i syfte att fastställa behovet av in vivo-test på ögonen. Trots att signifikant information kan fås genom utvärdering av enskilda parametrar (till exempel extrema pH-värden), bör den tillgängliga informationen utvärderas som en helhet. Alla relevanta data om den berörda kemikaliens och dess strukturella analogers verkningar bör utvärderas när man fattar ett beslut grundat på en weight-of-the-evidence-analys, och en motivering för beslutet bör anges. Huvudvikten bör läggas vid

[1] Om en integrerad testningsstrategi tillämpas med avseende på ögonirritation enligt Reach, se även Echas vägledning om informationskrav och kemikaliesäkerhetsbedömningar, kapitel R.7a: Särskild vägledning om endpoints: http://echa.europa.eu/documents/10162/13632/information_requirements_r7a_en.pdf

▼M7

befintliga data om kemikalien (både i fråga om människor och djur). Därefter följer resultatet av testning in vitro eller ex vivo. Testning in vivo av korrosiva kemikalier bör alltid undvikas när det är möjligt. Till de faktorer som bör beaktas inom ramen för testningsstrategin hör följande:

Utvärdering av befintliga data rörande människor och/eller djur och eller in vitro-data från validerade och internationellt vedertagna metoder (steg 1).

Befintliga data rörande människor, till exempel kliniska undersökningar eller undersökningar inom arbetslivet och fallstudier, och/eller djurförsöksdata från ögonstudier och/eller in vitro-data från validerade och internationellt vedertagna metoder för ögonirritation/ögonkorrosion bör beaktas först, eftersom de ger tillgång till information som direkt hör samman med verkningarna på ögonen. Därefter bör tillgängliga data från undersökningar på människor och/eller djur med avseende på hudkorrosion/hudirritation och/eller in vitro-data från validerade och internationellt vedertagna metoder för hudkorrosion utvärderas. Kemikalier med kända korrosiva egenskaper eller kemikalier som är kraftigt ögonirriterande bör inte appliceras på djurs ögon. Detsamma gäller kemikalier som ger korrosiva eller kraftigt irriterande verkningar på huden. Sådana kemikalier bör anses vara korrosiva och/eller irriterande även för ögonen. Om resultaten från tidigare utförda ögonstudier visar att en kemikalie inte är korrosiv eller irriterande, bör den inte heller testas på ögonen in vivo.

Analys av struktur-aktivitetssamband (SAR) (steg 2).

I mån av tillgänglighet bör resultaten från testning av strukturellt närbesläktade ämnen beaktas. Om det finns tillgång till data rörande människa och/eller djur för strukturellt närbesläktade ämnen eller blandningar av sådana ämnen, och dessa data är tillräckliga för att indikera att dessa ämnen har förmåga att framkalla ögonkorrosion/ögonirritation, kan man anta att testkemikalien kommer att framkalla samma respons. I sådana fall behöver kemikalien eventuellt inte testas. Negativa data från undersökningar med strukturellt närbesläktade ämnen eller blandningar av sådana ämnen utgör inte, inom ramen för strategin för stegvis testning, tillräckliga bevis på att en kemikalie skulle sakna korrosiva eller irriterande egenskaper. Validerade och godkända metoder som bygger på struktur-aktivitetssamband bör användas för att identifiera förmågan att framkalla korrosion och irritation på huden och ögonen.

Fysikalisk-kemiska egenskaper och kemisk reaktivitet (steg 3).

Kemikalier med extrema pH-värden såsom $\leq$ 2,0 eller $\geq$ 11,5 kan ha kraftiga lokala verkningar. Om ett extremt pH-värde används som grund för att konstatera att en kemikalie är korrosiv eller irriterande för ögonen, behöver eventuellt också ämnets syra/bas-reserv (buffertkapacitet) beaktas (5) (6) (7). Om buffertkapaciteten tyder på att kemikalien eventuellt inte är korrosiv för ögonen (dvs. kemikalier med extremt pH och låg syra-/basreserv), bör ytterligare testning utföras för att bekräfta detta. Härvid bör man helst använda validerade och godkända in vitro- eller ex vivo-tester (se punkt 10).

Beaktande av annan befintlig information (steg 4).

I detta steg bör man beakta all tillgänglig information om systemisk toxicitet när ett ämne tillförs via huden. Även testkemikaliens akuta toxicitet för huden bör beaktas. Om testkemikalien har konstaterats vara mycket toxisk när det tillförs via huden, behöver det eventuellt inte testas på ögonen. Även om det inte

▼M7

nödvändigt finns ett förhållande mellan akut toxicitet för huden och förmåga att framkalla ögonirritation/ögonkorrosion, kan man anta att ett ämne som har hög toxicitet vid tillförsel via huden, även har hög toxicitet när ämnet tillförs i ögonen. Sådana data kan även beaktas mellan steg 2 och steg 3.

Bedömning av kemikaliens hudkorrosion krävs även för tillsynsändamål (steg 5).

Kemikaliens förmåga att framkalla ögonkorrosion/ögonirritation bör först utvärderas med användning av testmetod B.4 (4) och dess tillägg (8), inklusive validerade och internationellt vedertagna metoder för in vitro-testmetoder med avseende på hudkorrosion 9) (10) (11). Om kemikalien veterligen framkallar korrosion eller allvarlig hudirritation, bör det betraktas som frätande eller kraftigt ögonirriterande. Då krävs inga ytterligare tester. Om kemikalien inte är korrosiv eller kraftigt irriterande för huden, bör ögontest in vitro eller ex vivo utföras.

Resultat från in vitro- eller ex vivo-test (steg 6).

Kemikalier som har visat sig framkalla korrosion eller kraftig irritation i ett in vitro- eller ex vivo-test (12) (13) som har validerats och godkänts specifikt för utvärdering av korrosion eller irritation på ögonen, behöver inte testas på djur. Man kan anta att sådana kemikalier framkallar liknande allvarliga verkningar in vivo. Om det inte finns tillgång till resultat från validerade och godkända in vitro- eller ex vivo-test, ska man hoppa över steg 6 och fortsätta förfarandet direkt från steg 7.

In vivo-test på kanin (steg 7 och 8).

In vivo-ögontest bör börja med ett preliminärt test på ett enskilt djur. Om resultatet av ett sådant test tyder på att kemikalien framkallar korrosion eller kraftig irritation i ögat, bör ingen ytterligare testning utföras. Om testresultatet tyder på att ämnet inte framkallar korrosion eller kraftig irritation, utförs ett bekräftande test med ytterligare två djur. Ytterligare tester kan behövas beroende på resultatet av det bekräftande testet [se testmetod B.5].

▼M7

TESTNINGS- OCH UTVÄRDERINGSSTRATEGI FÖR ÖGONIRRITATION/ÖGONKORROSION

	Aktivitet	Iakttagelse	Slutsats
1	Befintliga data rörande människor och/eller djur och eller in vitro-data från validerade och internationellt vedertagna metoder som visar verkningar på ögonen.	Allvarlig skada på ögonen.	Apikal endpoint, bör anses vara frätande för ögonen. Ingen testning behövs.
		Irriterande för ögonen.	Apikal endpoint, bör anses vara irriterande för ögonen. Ingen testning behövs.
		Ej frätande eller irriterande för ögonen.	Apikal endpoint, bör anses vara icke-frätande och icke-irriterande för ögonen. Ingen testning behövs.
	Befintliga data rörande människor och/eller djur och eller in vitro-data från validerade och internationellt vedertagna metoder som visar hudkorrosion.	Frätande för huden.	Bör antas vara frätande för ögonen. Ingen testning behövs.
	Befintliga data rörande människor och/eller djur och eller in vitro-data från validerade och internationellt vedertagna metoder som visar kraftig hudirritation.	Framkallar kraftig irritation på huden.	Bör antas vara irriterande för ögonen. Ingen testning behövs.
	↓		
	Ingen information tillgänglig, eller så är den tillgängliga informationen inte avgörande.		
	↓		
2	Undersök struktur-aktivitetssamband för ögonkorrosion/ögonirritation.	Allvarlig skada på ögonen kan förutses.	Bör antas vara frätande för ögonen. Ingen testning behövs.
		Irritation på ögonen kan förutses.	Bör antas vara irriterande för ögonen. Ingen testning behövs.
	Överväg struktur-aktivitetssamband för hudkorrosion.	Korrosivitet för huden kan förutses.	Bör antas vara frätande för ögonen. Ingen testning behövs.
	↓		
	Inga verkningar kan förutspås eller det som kan förutspås är inte avgörande eller negativt.		
	↓		
3	Mätning av pH (buffertkapacitet, om relevant).	pH $\leq$ 2 eller $\geq$ 11,5 (med hög buffertkapacitet, om relevant).	Bör antas vara frätande för ögonen. Ingen testning behövs.
	↓		
	2 < pH < 11,5 eller pH $\leq$ 2,0 eller $\geq$ 11,5 med låg buffertkapacitet, om relevant.		
	↓		
4	Överväg befintliga data om systemisk toxicitet via huden.	Kraftigt toxisk vid koncentrationer som skulle används vid test på ögonen.	Kemikalien är för toxisk för att testas. Ingen testning behövs.

▼M7

	Aktivitet	Iakttagelse	Slutsats
	↓		
	Sådan information är inte tillgänglig eller kemikalien har inte mycket hög toxicitet.		
	↓		
5	Experimentell bedömning av förmågan att framkalla hudkorrosion enligt testningsstrategin i kapitel B.4 i denna bilaga, om detta även krävs för tillsynsändamål.	Korrosiv eller kraftigt irriterande respons	Antag att kemikalien är ögonkorrosiv. Ingen ytterligare testning behövs.
	↓		
	Kemikalien är inte korrosiv eller kraftigt irriterande för huden		
	↓		
6	Utför validerade och godkända ögontest in vitro eller ex vivo.	Korrosiv eller kraftigt irriterande respons	Antag att kemikalien är korrosiv eller kraftigt irriterande för ögonen, under förutsättning att det utförda testet kan användas för att identifiera korrosiva/kraftigt irriterande kemikalier och kemikalien omfattas av testets tillämpningsområde. Ingen ytterligare testning behövs.
		Irriterande respons	Antag att kemikalien är ögonirriterande, under förutsättning att det eller de utförda testen kan användas för att korrekt identifiera korrosiva, kraftigt irriterande och irriterande kemikalier och kemikalien omfattas av testet eller testernas tillämpningsområde. Ingen ytterligare testning behövs.
		Icke-irriterande respons	Antag att kemikalien inte är ögonirriterande, under förutsättning att det eller de utförda testen kan användas för att korrekt identifiera ej irriterande kemikalier och korrekt särskilja dessa kemikalier från kemikalier som är irriterande, kraftigt irriterande eller korrosiva för ögonen, och kemikalien omfattas av testets tillämpningsområde. Ingen ytterligare testning behövs.
	↓		
	Validerade och godkända ögontest(er) in vitro eller ex vivo kan inte användas för att dra slutsatser.		
	↓		

▼M7

	Aktivitet	Iakttagelse	Slutsats
7	Utför preliminärt in vivo-test på kaninöga med ett individuellt djur.	Allvarlig skada på ögonen.	Anses vara korrosiv för ögonen. Ingen ytterligare testning behövs.
	↓		
	Ingen allvarlig skada, eller ingen respons		
	↓		
8	Utför bekräftande test på ytterligare ett eller två djur.	Korrosiv eller irriterande	Anses vara korrosiv eller irriterande för ögonen. Ingen ytterligare testning behövs.
		Ej korrosiv eller irriterande	Anses inte vara irriterande och korrosiv för ögonen. Ingen ytterligare testning behövs.

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. Anordnades i Solna, Sverige den 22–24 januari 1996 (http://www.oecd1.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. och Fentem J.H. (1999). A General Approach for Evaluating Stepwise Testing Strategies. ATLA 27, 161–177.

(4) Kapitel B.4 i denna bilaga, Akut hudirritation/hudkorrosion.

(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. och 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) Tillägg till kapitel B.4 i denna bilaga, Stegvis testningsstrategi för hudirritation och hudkorrosion.

(9) Kapitel B.40 i denna bilaga, in vitro-test av hudkorrosivitet: bestämning av transkutant elektriskt motstånd (TER).

(10) Kapitel B.40a i denna bilaga, in vitro-test av hudkorrosivitet: test med modell av human hud.

(11) OECD (2006), Test nr 435: In vitro Membrane Barrier Test Method for Skin corrosion, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, avsnitt 4, OECD Paris.

▼**M7**

(12) Kapitel B.47 i denna bilaga, testmetoden BCOP (Bovine Corneal Opacity and Permeability) för identifiering av i) kemikalier som orsakar allvarlig ögonskada och ii) kemikalier för vilka det inte krävs klassificering för ögonirritation eller allvarlig ögonskada.

(13) Kapitel B.48 i denna bilaga, testmetoden ICE (Isolated Chicken Eye Test) för identifiering av i) kemikalier som orsakar allvarlig ögonskada och ii) kemikalier för vilka det inte krävs klassificering för ögonirritation eller allvarlig ögonskada.

▼B

B.6 **HUDSENSIBILISERING**

1. **METOD**

1.1 INLEDNING

Kommentarer:

Testers noggrannhet och förmåga att spåra sådana ämnen som kan orsaka hudallergi hos människan anses betydelsefulla i ett klassificeringssystem för toxicitet som avser folkhälsan.

Det finns ingen enstaka testmetod som på ett lämpligt sätt kan identifiera samtliga de ämnen som kan vara sensibiliserande och som är relevant för alla ämnen.

Faktorer som ett ämnes fysikaliska egenskaper, inbegripet dess förmåga att penetrera huden, ska beaktas vid valet av test.

Två typer av test på marsvin har utvecklats: Ett test av adjuvanstyp i vilket man åstadkommer ett allergiskt tillstånd genom att upplösa eller suspendera (blanda) testsubstansen i Freunds Complete Adjuvant (FCA), och test av icke-adjuvanstyp.

Adjuvanstester är sannolikt mer precisa vad gäller att förutsäga ämnets eventuella kapacitet att orsaka hudsensibilisering hos människan än metoder där inte Freunds Complete Adjuvant används och de är därför att föredra.

Maximeringstest på marsvin (GPMT) används ofta som adjuvanstest. Trots att flera andra metoder kan användas för att upptäcka ett ämnes potentiella förmåga att orsaka hudsensibilisering anses maximeringsförsöket på marsvin vara den bästa metoden.

Icke-adjuvanstester (av vilka Buehler-testet föredras) med många kemiska klasser anses mindre känsliga.

I vissa fall anses det finnas goda skäl att välja Buehler-testet, som innebär lokal applicering i stället för den intradermala injektion som används i GPMT. Då Buehler-testet används ska detta vara vetenskapligt välmotiverat.

Här beskrivs GPMT och Buehler-testet. Andra metoder får användas, förutsatt att de är väldokumenterade och vetenskapligt motiverade.

Om en erkänd kontrollundersökning ger positiva resultat, kan testämnet betecknas som potentiellt sensibiliserande, och det behöver inte vara nödvändigt att genomföra ytterligare test på marsvin. Om en sådan kontrollundersökning dock ger negativt resultat ska ett test på marsvin genomföras enligt det förfarande som beskrivs i denna testmetod.

Se även Allmän inledning, del B.

▼B

1.2 DEFINITIONER

Hudsensibilisering (allergisk kontaktdermatit): En immunologiskt utlöst kutan reaktion på ett ämne. Hos människan kan reaktionerna kännetecknas av klåda, hudrodnad, ödem, blemmor och blåsor eller en kombination av dessa. Andra arter kan reagera annorlunda så att endast hudrodnad och ödem observeras.

Induktionsexponering: En försöksexponering av ett försöksobjekt för en testsubstans i syfte att inducera hypersensibilitet.

Induktionsperiod: En period på minst en vecka som följer efter induktionsexponering då hypersensibilitet kan utvecklas.

Provokationsexponering: En försöksexponering av ett tidigare behandlat objekt för att testa ämnet efter en induktionsperiod i syfte att bestämma om objektet reagerar med hypersensibilitet.

1.3 REFERENSÄMNEN

Den tillämpade försöksmetodens noggrannhet och tillförlitlighet bör utvärderas var sjätte månad genom användning av ämnen som är kända för att ha milda till moderata hudsensibiliseringsegenskaper.

I ett korrekt utfört test bör en reaktion på minst 30 % i adjuvanstest och minst 15 % i icke-adjuvanstest förväntas för milda/moderata sensibiliserande ämnen.

Följande ämnen är att föredra:

CAS-nummer	EINECS-nummer	EINECS-namn	Vanliga namn
101-86-0	202-983-3	α-hexylcinnamaldehyd	α-hexylcinnamaldehyd
149-30-4	205-736-8	benzotiasol-2-tiol (merkapto benzotiasol)	kaptax
94-09-7	202-303-5	benzokain	norkain

Då det är motiverat på grund av vissa omständigheter får andra kontrollämnen som uppfyller ovan angivna kriterier användas.

1.4 PRINCIP FÖR TESTMETODEN

Försöksdjuren exponeras inledningsvis för testsubstansen genom intradermala injektioner och/eller epidermal applicering (induktionsexponering). Efter en paus på 10–14 dagar (induktionsperiod) under vilken en immunreaktion kan utvecklas exponeras djuren för en provokationsdos. Omfattningen och graden av hudens reaktion på provokationsexponeringen hos försöksdjuren jämförs med den som uppträder hos kontrollgruppens djur som under induktionsexponeringen får skenbehandling och därefter utsätts för provokationsexponering.

1.5 BESKRIVNING AV TESTMETODERNA

Om det anses nödvändigt att avlägsna testsubstansen görs det med vatten eller en lämplig lösning utan att befintlig reaktion eller hudens tillstånd ändras.

▼B

1.5.1 *Maximeringstest på marsvin (GPMT)*

1.5.1.1 Förberedelser

Friska unga vuxna albinomarsvin acklimatiseras till laboratoriemiljö under minst fem dagar före försöket. Före försöket väljs djuren ut slumpvis och fördelas i behandlingsgrupper. Pälsen avlägsnas genom klippning, rakning eller eventuellt kemiskt, beroende på vilken testmetod som används. Försiktighet ska iakttas för att inte skada huden. Djuren vägs innan försöket påbörjas och då det avslutas.

1.5.1.2 Försöksförhållanden

1.5.1.2.1 Försöksdjur

Vanliga stammar av albinomarsvin används.

1.5.1.2.2 Antal och kön

Hannar och/eller honor kan användas. Om honor används ska de inte ha fått ungar och inte vara dräktiga.

Minst 10 djur används i behandlingsgruppen och minst 5 djur i kontrollgruppen. Om färre än 20 testdjur och 10 kontrolldjur har använts och det inte är möjligt att konstatera att testsubstansen är hudsensibiliserande, rekommenderas starkt tester med ytterligare djur upp till totalt 20 testdjur och 10 kontrolldjur.

1.5.1.2.3 Dosnivåer

Den testsubstanskoncentration som används vid varje induktionsexponering ska tolereras väl av hela organismen och vara den högsta nivå som orsakar mild till måttlig hudirritation. Den koncentration som används vid provokationsexponering ska vara den högsta icke-irriterande dosen. Om nödvändigt, kan de lämpliga koncentrationerna fastställas med hjälp av en pilotundersökning med två eller tre djur. För detta ändamål bör användningen av FCA-behandlade djur beaktas.

1.5.1.3 Förfarande

1.5.1.3.1 Induktion

Dag 0-behandlingsgrupp

Tre par intradermala injektioner på 0,1 ml ges i skuldertrakten, där pälsen avlägsnats, så att varje par injektioner görs på var sida om mittlinjen.

Injektion l: en 1:1-blandning (viktprocent) FCA/vatten eller fysiologisk saltlösning.

Injektion 2: Testsubstansen i lämplig vehikel i vald koncentration.

Injektion 3: Testsubstansen i vald koncentration i en 1:1-blandning (viktprocent) FCA/vatten eller fysiologisk saltlösning.

I injektion 3 löses de vattenlösliga ämnena i vattenfasen innan de blandas med FCA. Fettlösliga eller olösliga ämnen suspenderas (blandas) i FCA innan de blandas med vattenfasen. Testsubstansens slutliga koncentration ska vara densamma som den i injektion 2.

▼B

Injektionerna 1 och 2 ges med ett kort intervall och närmast huvudet medan injektion 3 ges i testområdets nedersta del.

Dag 0-kontrollgrupp

Tre par intradermala injektioner på 0,1 ml ges i samma område som på djuren i behandlingsgruppen.

Injektion l: en 1:1-blandning (viktprocent) FCA/vatten eller fysiologisk saltlösning.

Injektion 2: Outspädd vehikel.

Injektion 3: En 50 % blandning av vehikeln i en 1:1-blandning (viktprocent) FCA/vatten eller fysiologisk saltlösning.

Dag 5–7-behandlings- och kontrollgrupp

Om ämnet inte är hudirriterande behandlas testområdet, efter klippning eller rakning, ungefär 24 timmar före lokal applicering med 0,5 ml 10 % natriumlaurylsulfat i vaselin i syfte att orsaka lokal irritation.

Dag 6–8-behandlingsgrupp

Pälsen avlägsnas på nytt från testområdet. Testsubstansen i lämplig vehikel fördelas på ett filterpapper (2 × 4 cm), appliceras på testområdet och hålls i kontakt med huden genom täckande förband under 48 timmar. Valet av vehikel ska vara välmotiverat. Fasta ämnen pulveriseras och införlivas i en lämplig vehikel. Vätskor kan om det är lämpligt appliceras outspädda.

Dag 6–8-kontrollgrupp

Pälsen avlägsnas på nytt från testområdet. Vehikeln appliceras på liknande sätt på testområdet och hålls i kontakt med huden genom täckande förband under 48 timmar.

1.5.1.3.2 Provokation

Dag 20–22-behandlings- och kontrollgrupp

Pälsen avlägsnas från behandlings- och kontrolldjurens flanker. En kompress eller kammare innehållande testsubstansen appliceras på djurens ena flank och, om relevant, en kompress eller kammare innehållande enbart vehikel på den andra flanken. Kompresserna hålls i kontakt med huden genom täckande förband under 24 timmar.

1.5.1.3.3 Observation och gradering: Behandlings- och kontrollgrupp

— Cirka 21 timmar efter det att kompressen avlägsnats rengörs det provocerade området och klipps eller rakas och vid behov avlägsnas pälsen med hårborttagningsmedel.

— Cirka tre timmar senare (ungefär 48 timmar från det att provokationsexponeringen påbörjats) observeras hudreaktionen och noteras i enlighet med graderingen i tillägget.

— Cirka 24 timmar efter föregående observation görs en andra observation (72 timmar) och resultaten noteras.

Blindläsning av test- och kontrolldjur rekommenderas.

Om det är nödvändigt för att klargöra resultaten från den första provokationen bör en andra provokation (dvs. en omprovokation) övervägas en vecka efter den första, i tillämpliga fall med en ny kontrollgrupp. En omprovokation får också göras på den ursprungliga kontrollgruppen.

▼B

Alla hudreaktioner och ovanliga resultat, inbegripet systematiska reaktioner, som orsakas av induktions- och provokationsförfarandena bör observeras och noteras i enlighet med graderingsskalan enligt Magnusson/Kligman (se tillägget), övriga förfaranden t.ex. histopatologisk undersökning eller mätning av hudvecks tjocklek, bör utföras för att klargöra tveksamma reaktioner.

1.5.2 *Buehler-test*

1.5.2.1 F ö r b e r e d e l s e r

Friska unga vuxna albinomarsvins acklimatiseras till laboratoriemiljön under minst fem dagar före försöket. Före försöket väljs djuren ut slumpvis och fördelas i behandlingsgrupper. Pälsen avlägsnas genom klippning, rakning eller eventuellt kemiskt, beroende på den testmetod som används. Försiktighet ska iakttas för att inte skada huden. Djuren vägs innan försöket påbörjas och då det avslutas.

1.5.2.2 F ö r s ö k s f ö r h å l l a n d e n

1.5.2.2.1 Försöksdjur

Vanliga laboratoriestammar av albinomarsvin används.

1.5.2.2.2 Antal och kön

Hannar och/eller honor kan användas. Om honor används ska de inte ha fått ungar och inte vara dräktiga.

Minst 20 djur används i behandlingsgruppen och minst 10 djur i kontrollgruppen.

1.5.2.2.3 Dosnivåer

Testsubstansens koncentration anpassas till den högsta nivå som djuren har tolererat väl i varje induktionsstadium och ska vara den högsta nivå som orsakar mild till uthärdlig hudirritation. Den koncentration som används vid provokationsexponering ska vara den högsta icke-irriterade dosen. Om nödvändigt, kan de lämpliga koncentrationerna fastställas med hjälp av en pilotundersökning med två eller tre djur.

I fråga om vattenlösliga testmaterial är det lämpligt att använda vatten eller en icke-irriterande lösning av anjon-ytaktiva ämnen som vehikel. I fråga om övriga testmaterial är 80 % etanol/vatten att föredra för induktion och aceton för provokation.

1.5.2.3 F ö r f a r a n d e

1.5.2.3.1 Induktion

Dag 0-behandlingsgrupp

Pälsen avlägsnas från ena flanken (klipps).

Testkompressystemet dränks in med testsubstansen i lämplig vehikel (valet av vehikel ska vara välmotiverat; om lämpligt får testsubstanser i vätskeform appliceras outspädda). Testkompressystemet appliceras på testområdet och hålls i kontakt med huden med ocklusivkompress eller -kammare och lämpligt förband under sex timmar.

▼B

Testkompressystemet ska vara ocklusivt. En bomullskompress är lämplig och kan vara fyrkantig eller rund och cirka 4–6 cm^2. Fasthållning medelst lämpligt förband är lämpligt för att säkerställa ocklusion. Om omslag används kan ytterligare exponering krävas.

Dag 0-kontrollgrupp

Pälsen avlägsnas från ena flanken (klipps). Endast vehikeln appliceras på liknande sätt som för behandlingsgruppen. Testkompressystemet hålls i kontakt med huden genom ocklusivkompress eller -kammare och lämpligt förband under sex timmar. Om det kan visas att en simulerad kontrollgrupp inte krävs kan en oexponerad kontrollgrupp användas.

Dag 6–8- och 13–15-behandlings- och kontrollgrupp

Samma applicering som dag 0 utförs på samma testområde (vid behov efter avlägsnande av päls) på samma flank dag 6–8 och åter dag 13–15.

1.5.2.3.2 Provokation

Dag 27–29- behandlings- och kontrollgrupp

Pälsen avlägsnas från den obehandlade flanken på behandlings- och kontrolldjuren (klippning). En ocklusivkompress eller -kammare innehållande lämplig mängd testsubstans appliceras vid maximal icke-irriterande koncentration, på den bakre obehandlade flanken på behandlings- och kontrolldjuren.

I relevanta fall appliceras också en ocklusivkompress eller -kammare på den främre obehandlade flanken på både behandlings- och kontrolldjur. Kompresserna eller kamrarna hålls i kontakt med huden genom lämpligt förband under sex timmar.

1.5.2.3.3 Observation och gradering

— Cirka 21 timmar efter det att kompressen tagits bort avlägsnas pälsen från provokationsområdet.

— Cirka tre timmar senare (ungefär 30 timmar efter det att provokationskompressen applicerades) observeras hudreaktionerna och noteras i enlighet med graderingen i tillägget.

— Cirka 24 timmar efter 30-timmarsobservationen (ungefär 54 timmar efter det att provokationskompressen applicerades) observeras hudreaktionerna på nytt och noteras.

Blindläsning av test och kontrolldjur rekommenderas.

Om det är nödvändigt för att klargöra resultaten från den första provokationen bör en andra provokation (dvs. en förnyad provokation) övervägas en vecka efter den första, i tillämpliga fall med en ny kontrollgrupp. En förnyad provokation får också göras på den ursprungliga kontrollgruppen.

▼B

Alla hudreaktioner och ovanliga resultat, inbegripet systemiska reaktioner, som följer av induktions- och provokationsförfarandena bör observeras och noteras i enlighet med graderingsskalan enligt Magnusson/Kligman (se tillägget), övriga förfaranden, t.ex. histopatologisk undersökning eller mätning av hudvecks tjocklek, får utföras för att klargöra tveksamma reaktioner.

2. **DATA (GPMT och Buehler-test)**

Uppgifterna bör sammanfattas i tabellform som i fråga om varje djur visar hudreaktioner vid varje observation.

3. **RAPPORTERING (GPMT och Buehler-test)**

Om ett screeningsförsök utförs före marsvinsförsöket ska en beskrivning av eller hänvisning till försöket (t.ex. Local Lymph Node Essay (LLNA), Mouse Ear Swelling Test (MEST), inbegripet uppgifter om förfarandet, lämnas tillsammans med de resultat som erhållits genom försöket och referensämnena.

Försöksrapport (GPMT och Buehler-test)

Försöksrapporten ska om möjligt innehålla följande uppgifter:

Försöksdjur:

— Art/stam för använda marsvin.

— Djurens antal, ålder och kön.

— Härkomst, miljöbetingelser, foder etc.

— Djurens individuella vikt vid försökets inledning.

Försöksförhållanden:

— Metod för förberedelse av kompressområde.

— Uppgift om använt kompressmaterial och kompressmetod.

— Resultat av förundersökning med slutsatser om de induktions- och provokationskoncentrationer som ska användas i försöket.

— Uppgift om förberedelse av testsubstans, applicering och borttagning.

— Motivering för val av vehikel.

— Vehikel- och testsubstanskoncentrationer som används vid induktions- och provokationsexponering och den totala mängd ämne som appliceras vid induktion och provokation.

Resultat:

— En sammanfattning av resultaten av den senaste kontrollen av känslighet och tillförlitlighet (se 1.3), inbegripet uppgift om ämne, koncentration och använd vehikel.

▼B

— Resultatet för varje djur inklusive graderingssystem.

— Redogörelse för arten och graden av observerade effekter.

— Eventuella histopatologiska resultat.

Diskussion om resultaten.

Slutsatser.

4. **HÄNVISNINGAR**

Denna metod motsvarar OECD TG 406.

▼B

Tillägg

TABELL

Graderingsskala enligt Magnusson/Kligman för utvärdering av reaktioner på provokationskompresstest

0 = ingen synbar förändring

1 = lätt eller måttlig hudrodnad

2 = måttlig till stark hudrodnad

3 = intensiv hudrodnad och svullnad

▼M4

B.7 28-DAGARS TOXICITETSSTUDIE MED UPPREPAD ORAL DOSERING PÅ GNAGARE

INLEDNING

1. Den här testmetoden motsvarar OECD:s testriktlinje 407 (2008). Den ursprungliga testriktlinjen 407 antogs 19.81.1995 antogs en reviderad version för att erhålla ytterligare information från djuret som används i studien, i synnerhet om neurotoxicitet och immunotoxicitet.

2. 1998 inledde OECD en högprioriterad verksamhet för att se över befintliga testriktlinjer och utveckla nya riktlinjer för undersökning och testning av potentiellt endokrinstörande ämnen (8). Ett inslag i verksamheten var att uppdatera befintlig OECD-riktlinje för ”28-dagars toxicitetsstudie med upprepad oral dosering på gnagare” (TG407) med parametrar lämpliga för att upptäcka endokrin aktivitet för testkemikalier. Denna procedur genomgick ett omfattande internationellt program för att testa relevansen och tillämpbarheten av de kompletterande parametrarna, utförandet av dessa parametrar för kemikalier med (anti) östrogen-, (anti) androgen- och (anti) köldkörtelaktivitet och reproducerbarhet inom och mellan laboratorier samt de nya parametrarnas interferens med de som krävdes i den tidigare TG 407. Den stora mängden data som därvid erhölls har sammanställts och utvärderats i detalj i en omfattande OECD-rapport (9). Den här uppdaterade testmetoden B.7 (som är likvärdig med TG 407) är resultatet av de erfarenheter och resultat som uppnåddes under det internationella testprogrammet. Med den här testmetoden kan vissa endokrina indirekta verkningar sättas i samband med andra toxikologiska verkningar.

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN OCH BEGRÄNSNINGAR

3. Vid bedömningen och utvärderingen av de toxiska egenskaperna hos en kemikalie kan bestämningen av toxicitet med upprepad oral dosering genomföras efter att inledande information om toxicitet har erhållits genom testning av akut toxicitet. Avsikten med den här testmetoden är att undersöka effekterna på ett mycket brett spektrum av potentiella måltavlor för toxicitet. Den ger information om eventuella hälsorisker som kan uppstå vid upprepad exponering under en relativt begränsad tidsperiod, inklusive effekterna på nervsystemet, immunsystemet och det endokrina systemet. Vad beträffar dessa speciella endpoints, bör den identifiera kemikalier med neurotoxisk verkan, vilket kan motivera mer ingående undersökningar av denna aspekt, samt kemikalier som påverkar sköldkörtelns fysiologi. Den kan också tillhandahålla data om kemikalier som påverkar de manliga och/eller kvinnliga könsorganen hos unga vuxna djur samt ge indikationer på immunologiska effekter.

4. Resultaten från denna testmetod B.7 bör användas för faroidentifiering och riskbedömning. Resultaten som erhölls genom de endokrinrelaterade parametrarna bör sättas i samband med ”OECD:s ramverk för testning och bedömning av endokrinstörande kemikalier” (11). Metoden innefattar den grundläggande toxicitetsstudien med upprepad dosering som kan användas för kemikalier för vilka en 90-dagarsstudie inte är motiverad (t.ex. när produktionsvolymen inte överskrider vissa gränser) eller som en inledning till en långtidsstudie. Varaktigheten för exponeringen bör vara 28 dagar.

▼M4

5. Det internationella programmet som genomfördes om validering av parametrar lämpliga för upptäckt av en testkemikalies eventuella endokrina aktivitet visade att kvaliteten på datan som erhölls genom denna testmetod B.7 beror mycket på testlaboratoriets erfarenheter. Detta hänför sig särskilt till histopatologisk bestämning av cykliska förändringar i de kvinnliga fortplantningsorganen och viktbestämning av de små hormonberoende organen som är svåra att dissekera. Vägledning för histopatologi har utvecklats (19). Den finns på OECD:s offentliga webbplats om riktlinjer för testning. Den är avsedd för att hjälpa patologer i deras undersökningar och bidra till att öka analysens känslighet. En mängd olika parametrar befanns vara indikativa för endokrinrelaterad toxicitet och har införlivats i testmetoden. Parametrar för vilka det fanns tillräckliga data tillgängliga för att visa nyttan eller vilka visade svaga bevis i valideringsprogrammet för deras förmåga att detektera endokrinstörande ämnen föreslås som valfria endpoints (se tillägg 2).

6. På grundval av datan som genereras i valideringsprocessen, måste det framhållas att känsligheten hos denna analys inte är tillräcklig för att identifiera alla ämnen med (anti) androgena eller (anti) östrogena verkningssätt (9). Testmetoden genomförs inte i ett livsskede som är mest känslig för endokrina störningar. Dock har testmetoden under valideringsprocessen identifierat ämnen som svagt eller starkt påverkar sköldkörtelns funktion, och starka eller måttliga endokrina aktiva ämnen som verkar genom östrogena eller androgena receptorer, men som i de flesta fall misslyckades med att identifiera endokrina aktiva ämnen som svagt påverkar östrogena eller androgena receptorer. Därför kan den inte beskrivas som en screeninganalys av endokrin aktivitet.

7. Följaktligen kan avsaknaden av verkningar relaterade till dessa verkningsmekanismer inte tas som bevis på bristen av verkningar på det endokrina systemet. Beträffande indirekta endokrina verkningar bör därför inte ämnets karakterisering baseras enbart på resultaten från denna testmetod, men bör användas i en sammanvägd bedömning som omfattar alla befintliga data om en kemikalie för att karakterisera eventuell endokrin aktivitet. Av denna anledning bör regulatoriskt beslutsfattande om endokrin aktivitet (ämneskarakterisering) vara en bred strategi, inte enbart beroende av resultaten från tillämpningen av denna testmetod.

8. Det är erkänt att alla djurbaserade förfaranden kommer att överensstämma med lokala normer för djurvård; beskrivningarna av vård och behandling som anges nedan är miniminormer för prestanda som kommer att ersättas av strängare lokala bestämmelser. Ytterligare vägledning om human behandling av djur finns i OECD (14).

9. Definitioner som används finns i tillägg 1.

PRINCIP FÖR TESTMETODEN

10. Testkemikalien tillförs oralt dagligen i graderade doser till flera grupper av försöksdjur, en dosnivå per grupp för en period på 28 dagar. Under administreringsperioden observeras djuren varje dag noggrant för tecken på toxicitet. Djur som dör eller avlivas under testet obduceras, och i slutet av testet avlivas överlevande djur och obduceras. En 28-dagarsstudie ger information om effekterna av upprepad oral exponering och kan indikera behovet

▼M4

av ytterligare långtidsstudier. Den kan också ge information om valet av koncentrationer för långtidsstudier. Datan som härrör från användningen av testmetoden ska göra det möjligt att karakterisera teskemikaliens toxicitet som en indikation på förhållandet dos-respons och bestämningen av nivån där ingen skadlig effekt observeras (NOAEL).

METODBESKRIVNING

Val av djurart

11. Rekommenderad gnagare är råtta, även om andra gnagare kan användas. En utförlig motivering ska ges om de parametrar som anges i denna testmetod B.7 undersöks i andra gnagare. Även om det är biologiskt sannolikt att andra arter bör svara på gifter på liknande sätt som råttan, kan användningen av mindre arter resultera i ökad variabilitet på grund av tekniska utmaningar att dissekera mindre organ. I det internationella valideringsprogrammet för att detektera endokrinstörande ämnen, var råttan den enda art som användes. I testet bör unga friska vuxna djur användas av stammar som vanligtvis används på laboratorier. Honorna ska inte ha fått ungar och inte vara dräktiga. Doseringen bör inledas snarast möjligt efter avvänjningen, och under alla förhållanden innan djuren är nio veckor gamla. Vid inledningen av studien bör viktskillnaden hos de använda djuren vara minimal och inte överstiga ± 20 % av medelvikten för varje kön. När en upprepad oral dos utförs som inledning till en långtidsstudie, är det att föredra att djur från samma stam och ursprung används för båda studierna.

Inhysning och utfodring

12. Alla förfaranden bör överensstämma med lokala normer för laboratoriedjurvård. Temperaturen i försöksdjurens utrymmen bör vara 22 °C (± 3 °C). Den relativa fuktigheten bör vara minst 30 % och ska helst inte överstiga 70 % utom när rummet rengörs, bör målet vara 50–60 %. Belysningen bör vara artificiell med ljusperioden 12 timmar ljus och 12 timmar mörker. För utfodringen kan konventionellt laboratoriefoder användas med ett obegränsat utbud av dricksvatten. Valet av foder kan påverkas av behovet av att säkerställa en lämplig blandning av en testkemikalie när den administreras genom denna metod. Djuren bör vara inrymda i små grupper av samma kön. Djuren kan inhysas individuellt om det är vetenskapligt motiverat. Vid grupplacering i bur bör inte fler än fem djur inhysas per bur.

13. Fodret bör regelbundet analyseras beträffande föroreningar. Ett prov av fodret bör sparas tills rapporten är slutförd.

Förberedelse av djuren

14. Friska unga vuxna djur väljs slumpvis ut till kontroll- och behandlingsgrupperna. Burarna bör placeras så att en möjlig påverkan beroende på deras placering minimeras. Därefter identifieras djuren individuellt och får acklimatisera sig till laboratoriets betingelser i sina burar i minst fem dagar före behandlingsstudien.

Beredning av doser

15. Testkemikalien tillförs genom sondmatning eller via fodret eller dricksvattnet. Metoden för oral tillförsel är beroende av syftet med studien och de fysikaliska/kemiska/toxikologisk-kinetiska egenskaperna hos testkemikalien.

▼M4

16. Vid behov kan testkemikalien upplösas eller suspenderas i en lämplig vehikel. Det rekommenderas, när så är möjligt, att man först använder en vattenbaserad lösning/suspension följt av en lösning/suspension i olja (t.ex. majsolja) och därefter eventuell lösning i andra vehiklar. För vehiklar annat än vatten måste de toxiska egenskaperna hos vehikeln vara kända. Testkemikaliens stabilitet i vehikeln bör bestämmas.

PROCEDUR

Djurens antal och kön

17. Minst 10 djur (fem honor och fem hanar) bör användas för varje doseringsnivå. Om interimistisk avlivning planeras bör antalet djur ökas med det antal som man planerar att avliva innan studien slutförs. Man bör överväga en extra satellitgrupp på tio djur (fem per kön) i kontroll- och i toppdosgruppen för observation beträffande reversibilitet, persistens eller fördröjda toxiska verkningar under minst 14 dagar efter behandlingen.

Dosering

18. I allmänhet bör minst tre testgrupper och en kontrollgrupp användas, men ett toleranstest kan utföras om man efter utvärderingen av andra data inte förväntar sig några verkningar efter en dos på 1 000 mg/kg kroppsvikt/dag. Om det inte finns några lämpliga data tillgängliga kan en pilotstudie (djur av samma stam och ursprung) utföras för att underlätta bestämningen av de doser som ska användas. Med undantag av behandlingen med testkemikalien bör djuren i kontrollgruppen hanteras på exakt samma sätt som testgruppen. Om en vehikel används för att tillföra testkemikalien bör kontrollgruppen tillföras vehikeln i den största volym som används.

19. Nivåerna på doserna bör väljas med hänsyn till eventuell toxicitetsdata och (toxikologisk-) kinetiska data som finns tillgängliga om testkemikalien eller liknande kemikalier. Den högsta nivån på dosen bör väljas i syfte att inducera toxiska verkningar, men inte leda till döden eller orsaka svåra lidanden. Därefter bör en fallande nivå på doserna väljas i syfte att påvisa en dosrelaterad respons och ingen påvisbar skadlig effekt vid den lägsta dosnivån (NOAEL). Två- till fyrfaldiga dosintervall är ofta optimala för de fallande dosnivåerna, och att lägga till en fjärde testgrupp är att föredra framför att använda mycket stora intervall (t.ex. mer än faktor 10) mellan doseringarna.

20. Om allmän toxicitet observeras (t.ex. minskad kroppsvikt, verkningar på lever, hjärta eller njurar) eller andra förändringar som har observerats som kanske inte är toxiska reaktioner (t.ex. nedsatt födointag, leverförstoring), ska observerade effekter på immunförsvaret, neurologiska eller endokrint känsliga endpoints bör tolkas med försiktighet.

Toleranstest

21. Om ett test vid en dosnivå på minst 1 000 mg/kg kroppsvikt/dag eller, vid tillförsel via foder eller dricksvatten, en motsvarande procentandel i fodret eller dricksvattnet (baserad på fastställd kroppsvikt) genom användning av de förfaranden som beskrivs för denna studie, inte ger några observerbara toxiska verkningar och om ingen toxicitet förväntas på grundval av data från strukturellt närbesläktade kemikalier är det inte nödvändigt att genomföra en fullständig studie med tre doseringsnivåer. Toleranstestet tillämpas, utom när mänsklig exponering anger att en högre dosnivå ska användas.

▼M4

Administrering av doser

22. Djuren doseras dagligen med testkemikalier, 7 dagar per vecka under en period av 28 dagar. När testkemikalien tillförs genom sondmatning bör detta ske i en engångsdos via magsond eller lämplig intubationskanyl. Den största mängd vätska som kan administreras vid ett tillfälle beror på försöksdjurets storlek. Volymen bör inte överskrida 1 ml per 100 g kroppsvikt utom i de fall när vattenlösningar används, då kan 2 ml per 100 g kroppsvikt användas. Med undantag för irriterande eller frätande kemikalier, som normalt kommer att visa stegrade verkningar vid högre koncentrationer, bör variationer av testvolymen minimeras genom justering av koncentrationen, för att säkerställa en konstant volym vid alla dosnivåer.

23. För kemikalier som tillförs via foder eller dricksvatten är det viktigt att säkerställa att kvantiteterna av den berörda testkemikalien inte påverkar normal närings- eller vattenbalans. När testkemikalien tillförs via kosten kan antingen en konstant foderkoncentration (PPM) eller en konstant dosnivå i förhållande till djurens kroppsvikt användas; valet måste anges. När en kemikalie tillförs genom sondmatning bör dosen ges vid samma tidpunkt varje dag, och justeras vid behov för att upprätthålla en konstant dosnivå i förhållande till djurets kroppsvikt. Om en upprepad doseringsstudie används som inledning till en långtidsstudie ska ett liknande foder användas i båda studierna.

Observationer

24. Observationsperioden ska vara 28 dagar. Djuren i en satellitgrupp där uppföljande observationer planeras, ska hållas i minst 14 dagar utan behandling för att fördröjda eller kvarstående verkningar eller återhämtning från toxiska effekter ska kunna upptäckas.

25. Allmänna kliniska observationer bör göras minst en gång per dag, helst vid samma tidpunkt(er) med hänsyn till maximalt förväntade effekter efter doseringen. Djurens hälsotillstånd bör registreras. Minst två gånger dagligen bör djuren observeras beträffande morbiditet och mortalitet.

26. En gång före den första exponeringen (för att möjliggöra individuella jämförelser), och därefter minst en gång per vecka, ska ingående kliniska observationer göras av samtliga djur. Dessa observationer bör göras utanför buren på avsedd plats och helst vid samma tidpunkt varje gång. De bör noggrant registreras, helst med hjälp av ett poängsystem som utförligt definierats av testlaboratoriet. Ansträngningar bör göras för att säkerställa att testbetingelsernas variationer är minimala, och att observationerna utförs av någon som inte känner till behandlingen. Observationerna bör omfatta, men inte begränsas till, förändringar i hud, päls, ögon, slemhinnor, förekomst av sekret och utsöndringar samt autonom aktivitet (t.ex. tårflöde, upprest hårrem, pupillstorlek, ovanligt andningsmönster). Förändringar i gång, hållning och reaktion på hantering liksom eventuella kramper eller spasmer, stereotypier (t.ex. överdrivet putsande, repetitivt cirklande) eller bisarrt beteende (t.ex. självstympning, baklängesgång) ska också registreras (2).

27. Under fjärde exponeringsveckan bör bedömningar göras av sensoriska reaktioner på stimuli av olika slag (2) (t.ex. hörsel, syn och djupsensorisk stimuli) (3) (4) (5), bedömning av greppstyrka (6) och motorisk aktivitet (7). Ytterligare uppgifter om de procedurer som kan följas finns i respektive hänvisningar. Dock kan andra procedurer än de som hänvisats till användas.

▼M4

28. Funktionella observationer som görs under fjärde exponeringsveckan kan utelämnas om studien utförs som inledning till en subkronisk studie (90-dagars). I så fall bör de funktionella observationerna tas med i denna uppföljningsstudie. Å andra sidan kan tillgången på data om funktionella observationer från studien med upprepad dosering öka möjligheten att välja dosnivåer för en efterföljande subkronisk studie.

29. I undantagsfall kan funktionella observationer utlämnas för grupper som annars skulle uppvisa tecken på toxicitet i sådan utsträckning att det väsentligen skulle påverka funktionstestets prestanda.

30. Vid obduktion kan östruscykeln för alla honor bestämmas (valfritt) genom ett vaginalt utstrykprov. Dessa observationer ger information beträffande östruscykelns stadium vid tiden för avlivandet och hjälper till med den histologiska utvärderingen av östrogenkänsliga vävnader (se vägledning om histopatologi (19)).

Kroppsvikt och foder-/vattenkonsumtion

31. Alla djur bör vägas minst en gång i veckan. Mätning av foderkonsumtion bör göras minst en gång i veckan. Om testkemikalien tillförs via dricksvattnet bör även vattenkonsumtionen mätas minst en gång i veckan.

Hematologi

32. Följande hematologiska undersökningar bör göras i slutet av testperioden: hematokrit, hemoglobin koncentration, erytrocyträkning, retikulocyter, total och differential räkning av leukocyter, trombocyter och en mätning av blodets koaguleringstid/-potential. Andra bestämningar som bör utföras, om testkemikalien eller dess förmodade metaboliteter har eller misstänkas ha oxiderande egenskaper, inkluderar methemoglobinkoncentration och Heinzkroppar.

33. Blodprover bör tas från ett angivet ställe strax före eller som ett led i förfarandet för avlivning av djuren, och förvaras under lämpliga förhållanden. Djuren bör fasta över natten före avlivandet ([1]).

Klinisk biokemi

34. Kliniska biokemiska bestämningar för att undersöka betydande toxiska effekter på vävnader, särskilt påverkan på lever och njurar, bör utföras på blodprov tagna på samtliga djur strax före, eller som ett led i, avlivningsproceduren (bortsett från de döende och/eller de som avlivats före studiens upphörande). Undersökningar av plasma eller serum ska omfatta natrium, kalium, glukos, totalkolesterol, urinämne, kreatinin, totalprotein och albumin, minst två enzymer som indikerar effekter på leverceller (såsom alaninaminotransferas, aspartataminotransferas, alkaliskt fosfatas, γ-glutamyltranspeptidas och glutamatdehydrogenas), samt gallsyror. Mätningar av ytterligare enzymer (från lever eller annat ursprung) och bilirubin kan under vissa omständigheter ge användbar information.

35. Eventuellt kan också följande urinanalyser utföras under studiens sista vecka med klockad uppsamling av urinvolym: utseende, volym, osmolalitet eller specifik vikt, pH, protein, glukos och blod/blodceller.

([1]) För en rad olika mätningar i serum och plasma, särskilt för glukos, är nattlig fasta att föredra. Huvudorsaken till denna preferens är att den ökade variabilitet som oundvikligen följer av utebliven fasta skulle tendera att maskera subtilare effekter och försvåra tolkningen. Å andra sidan kan dock den nattliga fastan inkräkta på djurens allmänna metabolism och kan, särskilt under foderstudier, störa den dagliga exponeringen för testkemikalien. Om nattlig fasta används ska klinisk biokemisk bestämning utföras efter utförandet av funktionella observationer under vecka 4 i studien.

▼M4

36. Dessutom bör man överväga studier för att undersöka plasma- eller serummarkörer för allmänna vävnadsskador. Andra bestämningar som bör utföras, om kända egenskaper hos testkemikalien kan, eller misstänks, påverka relaterade metaboliska profiler, inkluderar kalcium, fosfat, triglycerider, specifika hormoner och kolinesteras. Dessa bör identifieras för kemikalier i vissa klasser, eller från fall till fall.

37. Även om man i den internationella utvärderingen av endokrinrelaterade endpoints inte kunde påvisa en klar fördel för bestämning av sköldkörtelhormoner (T3, T4) och TSH, kan det vara till hjälp att bevara plasma- eller serumprover för att mäta T3, T4 och TSH (valfritt), om det finns indikation på påverkan av hypofys-sköldkörtelaxeln. För att lagra proverna kan de frysas vid – 20 °. Följande faktorer kan påverka variationen och de absoluta koncentrationerna för hormonbestämningarna:

— Tidpunkt för avlivningen beroende på hormonkoncentrationernas dygnsvariation.

— Avlivningsmetod för att undvika onödig stress hos djuren som kan påverka hormonkoncentrationerna.

— Testsatser för hormonbestämningar som kan skilja sig åt genom sina standardkurvor.

En slutgiltig identifiering av sköldkörtelaktiva kemikalier är mer tillförlitlig genom histopatologisk analys snarare än hormonnivåer.

38. Plasmaprover särskilt avsedda för hormonbestämning bör tas vid en jämförbar tid på dagen. Det rekommenderas att man bör överväga om bestämningar av T3, T4 och TSH utlöstes på grund av förändringar av sköldkörtelns histopatologi. De numeriska värden som erhölls vid analys av hormonkoncentrationer skiljer sig åt mellan de olika analyssatser som finns i handeln. Därför är det kanske inte möjligt att tillhandahålla prestandakriterier baserade på enhetliga historiska data. Alternativt bör laboratorierna sträva efter att hålla variationskoefficienterna under 25 för T3 och T4, och under 35 för TSH. Alla koncentrationer ska anges i ng/ml.

39. Om historiska basdata är otillräckliga bör hänsyn tas till hematologiska och kliniska biokemiska variabler innan doseringen påbörjas eller företrädesvis för en uppsättning djur som inte ingår i försöksgrupperna.

PATOLOGI

Obduktion

40. Samtliga djur i studien bör underkastas en fullständig obduktion, som omfattar omsorgsfull granskning av kroppens yttre ytor, alla kroppsöppningar samt kranium, bröst- och bukhåla och deras innehåll. Lever, njurar, binjurar, testiklar, bitestiklar, prostata + sädesblåsor med koagulerade körtlar i sin helhet, bräss, mjälte, hjärna och hjärta från samtliga djur (med undantag av de döende och/eller de som har avlivats före studiens upphörande) ska putsas från angränsande vävnad vid behov, och deras våtvikt ska bestämmas så snart som möjligt efter dissektionen för att undvika uttorkning. Försiktighet måste iakttas vid putsning av prostatakomplexet för att undvika punktion av de vätskefyllda blåsorna. Alternativt kan sädesblåsor och prostata trimmas och vägas efter fixering.

▼M4

41. Dessutom skulle två andra vävnader eventuellt kunna vägas så snart som möjligt efter dissektionen, för att undvika uttorkning: parade äggstockar (våtvikt) och livmodern, inklusive livmoderhalsen (vägledning om borttagning och beredning av livmodervävnad för viktmätning finns i OECD:s TG 440 (18)).

42. Sköldkörtelns vikt (valfritt) kan bestämmas efter fixering. Putsning ska också göras väldigt försiktigt, och först efter fixeringen för att undvika vävnadsskador. Vävnadsskador kan äventyra den histopatologiska analysen.

43. Följande vävnader bör bevaras i det mest lämpade fixeringsmedlet för både vävnadstypen och den planerade efterföljande histopatologiska undersökningen (se punkt 47): Alla större skador, hjärna (representativa områden omfattande cerebrum, cerebellum och pons), ryggmärg, ögon, mage, tunn- och tjocktarm (inklusive Peyers plack), lever, njurar, binjurar, mjälte, hjärta, bräss, sköldkörtel, luftstrupe och lungor (konserverade genom uppumpning med fixermedel och därefter nedsänkning), könskörtlar (testiklar och äggstockar), accessoriska könsorgan (uterus och cervix, epididymes, prostata + sädesblåsor med koaguleringskörtlar), vagina, urinblåsa, lymfkörtlar (vid sidan av den mest proximala dräneringsnoden bör en annan lymfnod tas i enlighet med laboratoriets erfarenheter (15)), perifer nerv (ischias eller tibia) helst nära muskeln, skelettmuskel och ben med benmärg (sektion eller, alternativt, ett nymonterat benmärgsaspirat). Det rekommenderas att testiklarna fixeras genom nedsänkning i Bouins fixativ eller modifierat Davidsons fixativ (16) (17). Tunica albuginea måste försiktigt och ytligt punkteras med en nål på organets båda poler för en snabb inträngning av fixativet. Kliniska och andra fynd kan indikera behovet av att undersöka ytterligare vävnader. Också alla organ som sannolikt är målorgan, baserat på kunskap om testkemikaliens egenskaper, ska konserveras.

44. Följande vävnader kan ge värdefulla tecken på endokrinrelaterade effekter: Könskörtlar (äggstockar och testiklar), accessoriska könsorgan (uterus inklusive cervix, epididymis, sädesblåsor med koaguleringskörtlar, dorsolaterala och ventrala prostata), vagina, hypofys, manliga bröstkörtlar, sköldkörtel och binjurar). Förändringar i manliga bröstkörtlar är inte tillräckligt väl dokumenterade, men denna parameter kan vara väldigt känslig för ämnen med östrogen verkan. Observation av organ/vävnader som inte nämns i avsnitt 43 är valfria (se tillägg 2).

45. Vägledning om histopatologi (19) omfattar detaljerad information om dissektion, fixering, sektionering och histopatologi av endokrina vävnader.

46. I det internationella testprogrammet erhölls vissa belägg för att subtila endokrina verkningar av kemikalier med en låg potens för att påverka könshormonhomeostas, kan identifieras genom störning av östruscykelns synkronisering i olika vävnader, och inte så mycket genom franka histopatologiska förändringar i kvinnliga könsorgan. Även om inga direkta bevis erhölls för sådana effekter, rekommenderas att bevis för eventuell asynkroni i östruscykeln ska tas med i beräkningen vid tolkningen av äggstockarnas histopatologi (follikulära, thecala och granulosa celler), uterus, cervix och vagina. Om utvärderat kan det skede av cykeln som bestämts genom vaginala utstryk också ingå i denna jämförelse.

▼M4

Histopatologi

47. En fullständig histopatologisk undersökning bör utföras på bevarade organ och vävnader från samtliga djur i kontroll- och högdosgrupperna. Dessa undersökningar bör utsträckas till djur i alla andra doseringsgrupper, om behandlingsrelaterade förändringar observeras i högdosgruppen.

48. Alla större skador ska undersökas.

49. Om en satellitgrupp används bör en histopatologisk undersökning utföras på de vävnader och organ på vilka effekter har visats i de behandlade grupperna.

DATA OCH RAPPORTERING

Data

50. Individuella data ska lämnas. Därutöver bör alla data sammanfattas i tabellform, som för varje testgrupp visar antal djur vid testets början, antal djur som påfanns döda under testet eller som avlivats av humanitära skäl och tidpunkten för dödsfallen eller eutanasin, antal djur som visar tecken på toxicitet, en beskrivning av de tecken på toxicitet som observerats, inklusive tidpunkt för de första tecknen, varaktighet och hur allvarliga de toxiska verkningarna är, antal djur som uppvisar skador, typ av skador, deras svårighetsgrad och procentandelen djur som uppvisar varje typ av skada.

51. Om möjligt bör numeriska resultat utvärderas genom en lämplig och allmänt vedertagen statistisk metod. Vid jämförelser av effekten längs ett dosintervall bör man undvika användningen av multipla t-tester. Statistiska metoder ska väljas vid utformningen av studien.

52. Som kvalitetskontroll föreslås att historiska kontrolldata samlas in för numeriska data, och med dem beräknas variationskoefficienter, särskilt för de parametrar som kopplas till endokrinstörande upptäckt. Dessa data kan sedan användas för jämförelseändamål när aktuella studier utvärderas.

Testrapport

53. Testrapporten måste innehålla följande information:

Testkemikalie:

— Fysikalisk natur, renhet och fysikalisk-kemiska egenskaper.

— Identifikationsuppgifter.

Vehikel (i förekommande fall):

— Motivering för val av vehikel, om annan än vatten.

Försöksdjur:

— Art och stam som används.

— Djurens antal, ålder och kön.

— Ursprung, inhysning, kost etc.

— Djurens individuella vikt vid testets början.

— Motivering för val av art, om inte råtta.

Försöksbetingelser:

— Grund för valet av dosnivå.

— Uppgifter om testkemikaliens sammansättning/foderberedning, uppnådd koncentration, preparatets stabilitet och homogenitet.

▼**M4**

— Uppgifter om administreringen av testkemikalien.

— Omvandling från fodrets/dricksvattnets testkemikaliekoncentration (ppm) till faktisk dos (mg/kg kroppsvikt/dag), i förekommande fall.

— Uppgifter om foder- och vattenkvalitet.

Valfria endpoints som undersöktes

— Lista över valfria endpoints som undersöktes.

Resultat:

— Kroppsvikt/kroppsviktsförändringar.

— Foderkonsumtion och vattenkonsumtion, i förekommande fall.

— Uppgifter om toxiska reaktioner efter kön och dosnivå, inklusive tecken på toxicitet.

— Art, allvarlighetsgrad och varaktighet för kliniska observationer (huruvida de är reversibla eller ej).

— Bedömning av sensorisk aktivitet, greppstyrka och motorisk aktivitet.

— Blodundersökningar med relevanta basvärden.

— Kliniska biokemiska undersökningar med relevanta basvärden.

— Uppgifter om kroppsvikt vid avlivning och organvikt.

— Obduktionsfynd.

— En detaljerad beskrivning av samtliga histopatologiska fynd.

— Absorptionsdata, i förekommande fall.

— Statistisk bearbetning av resultaten, i tillämpliga fall.

Diskussion av resultaten.

Slutsatser.

▼M4

Tillägg 1

DEFINITIONER

Androgenicitet är förmågan hos en kemikalie att agera som ett naturligt androgent hormon (t.ex. testosteron) i en däggdjursorganism.

Antiandrogenicitet är förmågan hos en kemikalie att undertrycka verkan av ett naturligt androgent hormon (t.ex. testosteron) i en däggdjursorganism.

Anti-östrogenicitet är förmågan hos en kemikalie att undertrycka verkan av ett naturligt östrogent hormon (t.ex. 17ß-östradiol) i en däggdjursorganism.

Antityreoid aktivitet är förmågan hos en kemikalie att undertrycka verkan av ett naturligt sköldkörtelhormon (t.ex. T_3) i en däggdjursorganism.

Dosering är en allmän term som omfattar dos, dess frekvens och doseringens varaktighet.

Dos är den mängd testkemikalie som administreras. Dosen uttrycks som testkemikaliens vikt per enhet kroppsvikt av försöksdjur per dag (t.ex. mg/kg kroppsvikt/dag), eller som en konstant kostkoncentration.

Uppenbar toxicitet är en allmän term som beskriver tydliga tecken på toxicitet efter tillförsel av testkemikalien. Dessa bör vara tillräckliga för en riskbedömning och bör vara sådana att en ökning av den tillförda dosen kan förväntas resultera i utvecklingen av allvarliga toxicitetssymptom och sannolikt leda till mortalitet.

NOAEL är förkortningen för nivån där ingen skadlig effekt observeras. Detta är den högsta dosnivå där inga behandlingsrelaterade fynd observerats på grund av behandling.

Östrogenicitet är förmågan hos en kemikalie att agera som ett naturligt östrogent hormon (t.ex. 17ß-östradiol) i en däggdjursorganism.

Testkemikalie: Alla ämnen eller blandningar som testas med denna testmetod.

Tyreoid aktivitet är förmågan hos en kemikalie att agera som ett naturligt sköldkörtelhormon (t.ex. T_3) i en däggdjursorganism.

Validering är en vetenskaplig process utformad för att karakterisera de operativa kraven och begränsningarna hos en testmetod och visa dess tillförlitlighet och relevans för ett visst ändamål.

▼M4

Tillägg 2

Endpoints rekommenderade för upptäckt av endokrinstörande ämnen (EDS) i denna B.7-testmetod

Obligatoriska endpoints	Valfria endpoints
Vikt	
— Testiklar — Epididymis — Binjurar — Prostata + sädesblåsor med koagulerande körtlar	— Äggstockar — Uterus, inklusive cervix — Sköldkörtel
Histopatologi	
— Könskörtlar: — Testiklar och — Äggstockar — Accessoriska könsorgan: — Epididymis, — Prostata + sädesblåsa med koagulerande körtlar — Uterus, inklusive cervix — Binjure — Sköldkörtel — Vagina	— Vaginala utstryk — Manliga bröstkörtlar — Hypofys
Hormonmätningar	
	— Cirkulerande T3- och T4-nivåer — Cirkulerande TSH-nivåer

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 and Heindel JJ (eds). Academic Press: San Diego, CA, s. 52–85.

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

(18) OECD (2007). OECD Guideline for Testing of Chemicals N°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 INHALATIONSTOXICITET: 28-DAGARS STUDIE

SAMMANFATTNING

Denna reviderade B.8-testmetod har utformats för att fullständigt karakterisera testkemikaliens inhalationstoxicitet vid upprepade exponeringar under en begränsad tidsperiod (28 dagar), och för att tillhandahålla data för kvantitativa riskbedömningar. Grupper om minst 5 hangnagare och 5 hongnagare exponeras 6 timmar per dag under 28 dagar för a) testkemikalien vid tre eller fler koncentrationsnivåer, b) filtrerad luft (negativ kontroll, och/eller c) vehikeln (vehikelkontroll). Djur exponeras i allmänhet 5 dagar per vecka, men exponering 7 dagar per vecka är också tillåten. Hanar och honor testas alltid, men de kan exponeras vid olika koncentrationsnivåer om det är känt att ett kön är mer mottagligt för en viss testkemikalie. Denna metod ger försöksledaren flexibilitet att inkludera satellitgrupper (reversibilitet), lungsköljning (BAL), neurologiska tester och ytterligare klinisk patologi och histopatologiska utvärderingar för att bättre kunna karakterisera en testkemikalies toxicitet.

INLEDNING

1. Den här testmetoden motsvarar OECD:s testriktlinje 412 (2009). Den ursprungliga testriktlinjen 412 (TG 412) för subakut inhalation antogs 1981 (1). Den här testmetoden B.8 (som motsvarar den reviderade testriktlinjen 412) har uppdaterats för att återspegla vetenskapen och möta nuvarande och framtida lagstiftningsbehov.

2. Den här testmetoden medger karakterisering av negativa effekter efter upprepad daglig exponering genom inhalation av en testkemikalie under 28 dagar. Uppgifterna som kommer från en 28-dagars substudie av akut inhalationstoxicitet kan användas för kvantitativa riskbedömningar (om den inte följs av en 90-dagars studie av subkronisk inhalationstoxicitet (kapitel B.29 i denna bilaga)). Uppgifterna kan också ge information om valet av koncentrationer för långtidsstudier såsom 90-dagarsstudien av subkronisk inhalationstoxicitet. Den här testmetoden är inte specifikt avsedd för testning av nanomaterial. Definitioner som används inom ramen för den här metoden finns i slutet av det här kapitlet och i vägledningsdokumentet 39 (2).

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN

3. All tillgänglig information om testkemikalien bör beaktas av laboratoriet innan studien genomförs i syfte att höja studiens kvalitet och minimera djuranvändningen. Information som underlättar valet av lämpliga testkoncentrationer kan inkludera identitet, kemisk struktur, och fysikalisk-kemiska egenskaper hos testkemikalien, resultat från eventuella in vitro- eller in vivo-toxicitetstester, förväntad användning(ar) och risken för mänsklig exponering, tillgängliga (Q)SAR-data och toxikologiska data om strukturellt närbesläktade kemikalier och data från testning av akut inhalationstoxicitet. Om neurotoxicitet förväntas eller observeras under studiens gång, kan försöksledaren välja att inkludera lämpliga utvärderingar såsom en funktionell samlingsstudie (FOB) och mätning av motorisk aktivitet. Även om tidpunkter för exponeringar i förhållande till specifika undersökningar kan vara kritiska, bör resultaten från dessa extra aktiviteter inte störa studiens grundläggande utformning.

▼M4

4. Utspädning av korrosiva eller irriterande testkemikalier kan testas vid koncentrationer som kommer att ge den önskade graden av toxicitet (se GD 39 (2)). När djur utsätts för dessa material bör målkoncentrationerna vara tillräckligt låga för att inte orsaka avsevärd smärta och lidande, men ändå tillräckliga för att utsträcka koncentration-respons-kurvan till nivåer som gör att testets regulatoriska och vetenskapliga mål kan uppnås. Dessa koncentrationer bör väljas från fall till fall, företrädesvis baserade på en adekvat utformad undersökning av spännvidden som ger information om den kritiska endpointen, eventuellt tröskelvärde för irritation och tiden för de första tecknen (se punkterna 11–13). Motivering för valet av koncentration ska anges.

5. Döende djur eller djur som visar tecken på uppenbar smärta eller svårt och ihållande lidande ska avlivas skonsamt. Döende djur betraktas på samma sätt som de som dör under testet. Kriterier för att ta beslutet att avliva döende eller svårt lidande djur, och vägledning om hur man känner igen tecken på förutsägbar eller annalkande död, omfattas i OECD:s vägledningsdokument om humana endpoints (3).

METODBESKRIVNING

Val av djurart

6. I testet bör friska unga vuxna gnagare användas av stammar som vanligtvis används på laboratorier. För detta test används råtta. Motivering ska ges om annan art används.

Förberedelse av djuren

7. Honorna ska inte ha fått ungar och inte vara dräktiga. På dagen för randomiseringen bör djuren vara unga vuxna 7 till 9 veckor gamla. Kroppsvikten bör ligga inom ± 20 % av medelvikten för vardera könet. Djuren väljs ut slumpvis och märks för individuell identifikation, och får därefter acklimatisera sig till laboratoriets betingelser i sina burar i minst fem dagar före teststarten.

Djurhållning

8. Djuren bör identifieras individuellt, om möjligt med subkutana transpondrar för att underlätta observationer och undvika förvirring. Temperaturen i försöksdjurens utrymmen bör vara 22 ± 3 °C. Den relativa fuktigheten bör ligga mellan 30 och 70 %, även om detta kanske inte är möjligt när vatten används som vehikel. Före och efter exponeringen bör djuren inhysas i grupper avhängigt kön och koncentration, dock får antalet djur per bur inte hindra en tydlig observation av varje enskilt djur, och förluster genom kannibalism och slagsmål bör minimeras. Om endast djurens nosar ska exponeras kan det vara nödvändigt att de får acklimatisera sig till fasthållningsrören. Fasthållningsrören ska inte medföra onödig fysisk, termisk eller fasthållningsstress för djuren. Fasthållning kan påverka fysiologiska endpoints såsom kroppstemperatur (hypotermi) och/eller minimala respiratoriska volymer. Om det finns generiska data tillgängliga som inte pekar på sådana förändringar i någon nämnvärd omfattning är det inte nödvändigt med anpassningen till rören före exponeringen. Djur vars hela kroppar ska exponeras för en aerosol ska inhysas individuellt under exponeringen för att förhindra att de andra djuren i buren filtrerar aerosolen genom sina pälsar. För utfodringen kan konventionellt laboratoriefoder användas, utom under exponeringen, tillsammans med en obegränsad tillgång till vatten. Belysningen bör vara artificiell med omväxlande 12 timmar ljus och 12 timmar mörker.

▼M4

Inhalationskammare

9. Vid val av inhalationskammare bör man beakta kemikaliens beskaffenhet och ändamålet med testet. Det föredragna exponeringssättet är enbart nos (termen inkluderar även enbart huvud, enbart nos eller enbart tryne). Exponering av enbart nos föredras i allmänhet vid studier av vätskor och fasta aerosoler och ånga som kan kondenseras och bilda aerosoler. Vissa av undersökningens mål kan bättre uppnås genom exponering av hela kroppen, men detta ska motiveras i undersökningsrapporten. För att säkerställa atmosfärisk stabilitet vid användningen av en helkroppskammare ska den totala ”volymen” försöksdjur inte överskrida 5 % av kammarens volym. Teknikerna för enbart nos och helkroppsexponeringens deras principer och särskilda för- och nackdelar behandlas i GD 39 (2).

TOXICITETSSTUDIER

Koncentrationsgränser

10. Till skillnad från akuta studier finns det inga fastställda koncentrationsgränser i 28-dagarsstudier av subakut inhalationstoxicitet. För den högsta testade koncentrationen bör man beakta: 1) högsta möjliga koncentration, 2) värsta tänkbara fall av mänsklig exponering, 3) behovet av att ge en tillräcklig syretillförsel och/eller 4) djurskyddsskäl. I avsaknad av databaserade gränsvärden får de akuta gränsvärdena i förordning (EG) nr 1272/2008 (13) användas (dvs. upp till en högsta koncentration av 5 mg/l för aerosoler, 20 mg/l för ångor och 20 000 ppm för gaser), se GD 39 (2). Motivering ska ges om det är nödvändigt att överskrida dessa gränsvärden vid testning av gaser eller mycket flyktiga testkemikalier (t.ex. köldmedier). Koncentrationsgränsen bör framkalla tydlig toxicitet utan att utsätta djuren för onödig stress eller påverka deras livslängd (3).

Spännviddsstudie

11. Innan huvudstudien påbörjas kan det vara nödvändigt att genomföra en spännviddsstudie. En spännviddsstudie är mer omfattande än en inledande studie eftersom den inte är begränsad till valet av koncentration. Kunskap från en spännviddsstudie kan leda till en lyckad huvudstudie. En spännviddsstudie kan till exempel ge teknisk information om analysmetoder, partikeldimensionering, upptäckt av toxiska mekanismer, klinisk patologi- och histopatologidata, och en uppskattning av vad som kan vara NOAEL- och MTC-koncentrationer i en huvudstudie. Försöksledaren kan välja att använda en spännviddsstudie för att identifiera tröskelvärdet för irritation i luftvägarna (t.ex. med histopatologi i luftvägarna, lungfunktionstest eller lungsköljning), den övre koncentration som tolereras utan att djuren utsätts för onödig stress och parametrarna som bäst kännetecknar en testkemikalies toxicitet.

12. En spännviddsstudie kan bestå av en eller flera koncentrationsnivåer. Inte fler än tre hanar och tre honor ska exponeras vid varje koncentrationsnivå. En spännviddsstudie ska pågå under minst 5 dagar och vanligtvis inte mer än i 14 dagar. Motiveringen för valet av koncentrationer till huvudstudien ska ges i undersökningsrapporten. Syftet med huvudstudien är att påvisa ett koncentration-respons-förhållande baserat på vad som förväntas vara den mest känsliga endpointen. Den låga koncentrationen bör helst vara en koncentration utan en påvisbar skadlig effekt medan den höga koncentrationen bör framkalla tydlig toxicitet utan att utsätta djuren för onödig stress eller påverka deras livslängd (3).

▼M4

13. Vid valet av koncentrationsnivåer för spännviddsstudien bör all tillgänglig information beaktas, inklusive struktur-aktivitetsförhållanden samt data för liknande kemikalier (se punkt 3). En spännviddsstudie kan verifiera/motbevisa vad som anses vara de endpoints som är mest mekanistiskt baserade, t.ex. kolinesterasinhibition av organiska fosforföreningar, methemoglobinbildning av erytrocytotoxiska agens, sköldkörtelhormoner (T_3, T_4) för tyreotoxiska ämnen, protein, LDH eller neutrofiler i bronkialsköljning för ofarliga svårlösliga partiklar eller lungretande aerosoler.

Huvudstudie

14. Huvudstudien för subakut toxicitet består i allmänhet av tre koncentrationsnivåer och även samtidiga negativa (luft) och/eller vehikelkontroller efter behov (se punkt 17). Alla tillgängliga data bör användas för att underlätta valet av lämpliga exponeringsnivåer, inklusive resultaten från de systematiska toxicitetsstudierna, metabolism och kinetik (särskild vikt bör läggas vid att undvika höga koncentrationsnivåer som mättar kinetiska processer). Varje testgrupp består av minst 10 gnagare (5 hanar och 5 honor) som exponeras för testkemikalien 6 timmar per dag 5 dagar per vecka under en period på 4 veckor (total studielängd 28 dagar). Djuren kan också exponeras 7 dagar per vecka (t.ex. vid testning av läkemedel som inhaleras. Om ett kön är känt för att vara mer mottagligt för en viss testkemikalie kan könen exponeras vid olika koncentrationsnivåer för att optimera koncentrationsresponsen enligt beskrivningen i punkt 15. Om andra gnagare än råttor exponeras enbart nos, får maximala exponeringstider justeras för att minska artspecifikt lidande. En motivering bör ges när man använder en kortare exponeringstid än 6 timmar/dag, eller när det är nödvändigt att utföra en helkroppsexponeringsstudie med lång varaktighet (t.ex. 22 timmar/dag) (se GD 39 (2)). Inget foder ska ges under exponeringsperioden, om den inte överskrider 6 timmar. Vatten kan tillhandahållas under en helkroppsexponering.

15. Den målkoncentration som valts ska identifiera målorgan(en) och påvisa en tydlig koncentrationsrespons:

— Den höga koncentrationsnivån bör leda till toxiska effekter, men inte orsaka kvardröjande tecken eller dödlighet, vilket kan förhindra en meningsfull utvärdering.

— Den mellanliggande koncentrationsnivån(erna) bör spridas ut för gradering av toxiska effekter mellan den låga och höga koncentrationen.

— Den låga koncentrationsnivån bör frambringa få eller inga belägg för toxicitet.

Satellitstudie (reversibilitet)

16. En satellitstudie (reversibilitet) kan användas för att observera reversibilitet, persistens eller fördröjd toxicitet för en efterbehandlingsperiod av lämplig längd, dock inte mindre än 14 dagar. Satellitgrupper (reversibilitet) består av fem hanar och fem honor som exponeras samtidigt med försöksdjuren i huvudstudien. Satellitstudiegrupper bör exponeras för testkemikalien vid den högsta koncentrationsnivån och det bör finnas samtidiga luft- och/eller vehikelkontroller efter behov (se punkt 17).

▼M4

Kontrolldjur

17. Samtidiga negativa (luft-) kontrolldjur bör hanteras på ett sätt som är identiskt med djuren i testgruppen, förutom att de exponeras för filtrerad luft i stället för testkemikalien. När vatten eller annat ämne används för att generera testatmosfären bör en vehikelkontrollgrupp i stället för en negativ (luft-) kontrollgrupp ingå i studien. Vatten bör användas som vehikel närhelst det är möjligt. När vatten används som vehikel bör kontrolldjuren exponeras för luft med samma relativa fuktighet som de exponerade grupperna. Valet av en lämplig vehikel bör grunda sig på en lämpligt utförd förstudie eller historiska data. Om en vehikels toxicitet inte är känd kan försöksledaren välja att använda både en negativ (luft-) kontroll och en vehikelkontroll, men det rekommenderas inte. Om historiska data visar att en vehikel inte är toxisk finns det inget behov av en negativ (luft-) kontrollgrupp och då bör endast en vehikelkontroll användas. Om en förstudie av en testkemikalie som beretts i en vehikel inte visar någon toxicitet, framgår det att vehikeln inte är toxisk vid den testade koncentrationen och att denna vehikelkontroll bör användas.

EXPONERINGSBETINGELSER

Administration av koncentrationer

18. Djur exponeras för testkemikalien som en gas, ånga, aerosol eller en blandning av dem. Det fysikaliska tillstånd som ska testas beror på testkemikaliens fysikalisk-kemiska egenskaper, vald koncentration och/eller dess mest sannolika fysikaliska form vid hanteringen och användningen. Hygroskopiska och kemiskt reaktiva testkemikalier ska testas i torr luft. Det är viktigt att se till att inga explosiva koncentrationer skapas. För att minska partikelstorleken kan partikelmaterialet utsättas för mekaniska processer. Mer vägledning finns i GD 39 (2).

Partikelstorleksfördelning

19. Partikeldimensionering bör utföras för alla aerosoler och ångor som kan kondenseras och bilda aerosoler. För att möjliggöra exponering av alla relevanta områden i luftvägarna, rekommenderas aerosoler med en aerodynamisk diameter (MMAD) i intervallet 1 till 3 μm med en geometrisk standardavvikelse (σ_g) i intervallet 1,5 till 3,0 (4). Även om en rimlig ansträngning krävs för att uppfylla denna standard, bör en sakkunnig bedömning ges om detta inte kan uppnås. Till exempel kan rökpartiklar av metall vara mindre än denna standard, och laddade partiklar och fibrer kan överstiga den.

Beredning av testkemikalie i en vehikel

20. Testkemikalien ska helst testas utan en vehikel. Om det är nödvändigt att använda en vehikel för att generera en lämplig koncentration och partikelstorlek av testkemikalien, bör vatten ges företräde. Närhelst en testkemikalie är upplöst i en vehikel ska dess stabilitet påvisas.

ÖVERVAKNING AV EXPONERINGSFÖRHÅLLANDEN

Kammarens luftflöde

21. Luftflödet genom exponeringskammaren ska omsorgsfullt kontrolleras, kontinuerligt övervakas och registreras minst en gång i timmen under varje exponering. Övervakningen i realtid av testatmosfärens koncentration (eller temporal stabilitet) är en integrerad mätning av samtliga dynamiska parametrar och ger ett indirekt sätt att kontrollera alla relevanta dynamiska inhalationsparametrar. Om koncentrationen övervakas i realtid kan mätfrekvensen för luftflöden minskas till en enda mätning per exponeringsdag.

▼M4

Särskild hänsyn bör tas för att undvika återandning i enbart nos-kammare. Syrehalten bör vara minst 19 % och koncentrationen av koldioxid bör inte överstiga 1 %. Om det finns anledning att tro att denna standard inte kan uppfyllas bör man mäta koncentrationen av syre och koldioxid. Om mätningar under den första exponeringsdagen visar att dessa gaser har korrekta nivåer behöver inga fler mätningar utföras.

Kammarens temperatur och relativa fuktighet

22. Kammarens temperatur bör upprätthållas vid 22 ± 3 °C. Relativ fuktighet i djurens andningszoner, för både enbart nos och helkroppsexponering, bör om möjligt övervakas kontinuerligt och registreras varje timme för varje exponering. Den relativa fuktigheten bör helst upprätthållas inom intervallet 30 till 70 %, men detta kanske inte är möjligt (t.ex. vid testning av vattenbaserade blandningar), eller inte mätbart på grund av att testkemikalien stör själva testmetoden.

Testkemikalie: nominell koncentration

23. När det är möjligt bör den nominella koncentrationen i exponeringskammaren beräknas och registreras. Den nominella koncentrationen är massan av den genererade testkemikalien dividerad med den totala volymen av luft som passerade genom inhalationskammarsystemet. Den nominella koncentrationen används inte för att karakterisera djurens exponering, men en jämförelse mellan den nominella koncentrationen och den faktiska koncentrationen ger en indikation på testsystemets genereringsprestanda, och kan därmed användas för att upptäcka genereringsproblem.

Testkemikalie: faktisk koncentration

24. Den faktiska koncentrationen är testkemikaliekoncentrationen som samlats in i djurets andningsområde i en inhalationskammare. Faktiska koncentrationer kan erhållas antingen genom särskilda metoder (t.ex. direkt provtagning, adsorptiva eller kemiskt reaktiva metoder, och efterföljande analytisk karakterisering) eller genom icke-specifika metoder såsom gravimetrisk filteranalys. Användningen av gravimetrisk analys är endast acceptabel för pulveraerosoler bestående av en enda komponent eller aerosoler bestående av vätskor med låg flyktighet, och bör stödjas av en lämplig preklinisk studie med kemikaliespecifik karakterisering. Koncentrationen i pulveraerosoler bestående av flera komponenter kan också bestämmas genom gravimetrisk analys. Detta kräver dock analysresultat som visar att sammansättningen av luftburet material liknar startmaterialet. Om denna information inte finns tillgänglig kan det vara nödvändigt med en ny analys av testkemikalien (helst i sitt luftburna tillstånd) under loppet av studien. För medel i aerosolform som kan förångas eller sublimeras bör man kunna visa att samtliga faser uppsamlades med den valda metoden.

25. En sats av testkemikalien ska användas genom hela studien, om möjligt, och provet ska lagras under sådana förhållanden att det bibehåller sin renhet, homogenitet och stabilitet. Inför starten av studien bör det finnas en beskrivning av testkemikalien som inbegriper dess renhet och, om det är tekniskt genomförbart, identitet, och kvantiteterna av identifierade föroreningar och orenheter. Detta kan visas genom, men är inte begränsat till, följande data: retentionstid och relativ topparea, molekylvikt från masspektroskopi eller gaskromatografianalys, eller andra uppskattningar. Även om testlaboratoriet inte ansvarar för provets identitet kan det vara klokt att man i stora drag bekräftar karakteriseringen (t.ex. färg, fysisk natur etc.).

▼M4

26. Exponeringsatmosfären ska hållas så konstant som möjligt. En enhet för realtidsövervakning, såsom en aerosolfotometer för aerosoler eller en analysator för totalkolväte för ångor kan användas för att påvisa stabilitet hos exponeringsförhållandena. Faktisk kammarkoncentration bör mätas minst 3 gånger varje exponeringsdag vid varje exponeringsnivå. Om det inte är möjligt på grund av begränsade luftflöden eller låga koncentrationer, är det acceptabelt med ett prov per exponeringsperiod. Helst ska detta prov sedan samlas in under hela exponeringsperioden. Provtagning av kammarkoncentrationer från individuella kammare bör inte avvika från den genomsnittliga koncentrationen med mer än ± 10 % för gaser och ångor, och inte med mer än ± 20 % för flytande eller fasta aerosoler. Tid för att uppnå kammarjämvikt (t_{95}) bör beräknas och rapporteras. Varaktigheten för en exponering sträcker sig över den tid som testkemikalien genereras. Detta tar hänsyn till den tid som krävs för att uppnå kammarens jämvikt (t_{95}) och sönderfall. Riktlinjer för att uppskatta t_{95} finns i GD 39 (2).

27. För mycket komplexa blandningar bestående av gaser/ångor och aerosoler (t.ex. förbränningsatmosfärer och testkemikalier framdrivna från därför avsedd slutanvändningsprodukt/-utrustning) kan varje fas bete sig olika i en inhalationskammare. Därför ska minst ett indikatorämne väljas (analyt), vanligtvis det huvudsakliga aktiva ämnet i blandningen för varje fas (gas/ånga och aerosol). När testkemikalien är en blandning ska den analytiska koncentrationen i totalblandningen rapporteras, inte bara den aktiva ingrediensen eller indikatorämnet (analyten). Ytterligare information om faktisk koncentration finns i GD 39 (2).

Testkemikalie: partikelstorleksfördelning

28. Aerosolers partikelstorleksfördelning bör fastställas minst en gång i veckan för varje koncentrationsnivå med hjälp av en kaskadimpaktor eller ett alternativt instrument såsom en aerodynamisk partikelsorterare (APS). Om man kan visa ett likvärdigt resultat från en kaskadimpaktor och det alternativa instrumentet, kan man använda det sistnämnda under hela studien.

29. En andra enhet, till exempel ett gravimetriskt filter eller en impinger/gasbubblare, bör användas parallellt med det primära instrumentet för att bekräfta uppsamlingsprestandan hos det primära instrumentet. Masskoncentrationen som erhållits genom analys av partikelstorleken ska ligga inom rimliga gränser för den masskoncentration som erhållits genom filteranalys (se GD 39 (2)). Om likvärdigheten kan påvisas för alla koncentrationer som testats i ett tidigt skede av försöket, kan ytterligare bekräftande mätningar utelämnas. Av hänsyn till djurskyddsskäl bör åtgärder vidtas för att minimera ofullständiga uppgifter som kan leda till att studien måste upprepas.

30. Partikeldimensionering bör utföras för ångor om det finns en möjlighet att kondensen kan bilda en aerosol, eller om partiklar upptäcks i ångatmosfären som kan göra så att faserna blandas.

IAKTTAGELSER

31. Djuren bör observeras kliniskt före, under och efter exponeringsperioden. Mer frekventa iakttagelser kan indikeras beroende på djurens respons under exponeringen. När iakttagelser av djuren hindras genom användning av fasthållningsrör, dåligt upplysta kroppskammare eller ogenomskinlig atmosfär, bör djuren noga observeras efter exponeringen. Observationer före nästa dags exponering kan utvärdera eventuell reversibilitet eller stegrande toxiska effekter.

▼M4

32. Alla observationer registreras med individuell registrering för varje djur. När djur avlivas av humanitära skäl eller påträffas döda, ska tidpunkten för dödsfallet registreras så noggrant som möjligt.

33. Observationer vid buren bör omfatta förändringar i hud och päls, ögon och slemhinnor, förändringar i andnings- och cirkulationssystemen, förändringar i nervsystemet, samt förändringar i kroppsmotorik och beteendemönster. Uppmärksamhet bör fästas vid iakttagelser av tremor, konvulsioner, salivutsöndring, diarré, letargi, sömn och koma. Mätningen av rektala temperaturer kan ge belägg för bradypnéreflex eller hypo/hypertermi relaterat till behandling eller inspärrning. Ytterligare utvärderingar kan inkluderas i studiens protokoll såsom kinetik, biologisk övervakning, lungfunktion, retention av svårlösliga ämnen som ackumuleras i lungvävnad, samt beteendeförändringar.

KROPPSVIKT

34. De enskilda djurens vikt bör registreras strax före den första exponeringen (dag 0), därefter två gånger i veckan (till exempel på fredagar och måndagar för att påvisa återhämtning över ett exponeringsfritt veckoslut eller under ett tidsintervall för bedömning av systematisk toxicitet), och vid tidpunkten för dödsfallet eller avlivningen. Visas inga effekter under de två första veckorna kan kroppsvikterna mätas en gång i veckan för återstoden av studien. Satellitdjur (reversibilitet) (om det används) ska fortsätta vägas varje vecka under hela återhämtningsperioden. Vid studiens upphörande bör samtliga djur vägas strax före avlivningen för en objektiv beräkning av förhållandet organ-kroppsvikt.

FÖDO- OCH VATTENINTAG

35. Födointaget bör mätas varje vecka. Vattenintaget bör också mätas.

KLINISK PATOLOGI

36. Kliniska patologiska bedömningar bör göras av samtliga djur, inklusive kontroll- och satellitdjur (reversibilitet) när de avlivas. Tidsintervallet mellan exponeringens upphörande och insamlingen av blod ska registreras, i synnerhet när rekonstitueringen av endpointen är snabb. Provtagning efter att exponeringen har upphört indikeras för dessa parametrar med ett kort plasmaprov halvtid (t.ex. COHb, CHE och MetHb).

37. Tabell 1 listar de kliniska patologiska parametrar som i allmänhet krävs för alla toxikologiska studier. Urinanalys krävs inte rutinmässigt, men kan utföras när det bedöms lämpligt utifrån förväntad eller observerad toxicitet. Försöksledaren kan välja att bedöma ytterligare parametrar för att bättre kunna karakterisera en testkemikalies toxicitet (t.ex. kolinesteras, lipider, hormoner, syra/bas-balans, methemoglobin eller Heinz-kroppar, kreatinkinas, myeloid/erytroid-förhållande, troponiner, arteriella blodgaser, laktatdehydrogenas, sorbitoldehydrogenas, glutamatdehydrogenas och gamma-glutamyltranspeptidas).

▼M4

Tabell 1

Standardiserade parametrar för klinisk patologi

Hematologi	
Erytrocytantal	Totalt antal leukocyter
Hematokrit	Differentalt leukocytantal
Hemoglobinkoncentration	Trombocytantal
Medelvärde för korpuskulärt hemoglobin	Koaguleringsförmåga (välj ett alternativ):
Medelvärde för korpuskulär volym	— Protrobintid
Medelvärde för korpuskulär hemoglobinkoncentration	— Koagulationstid
Retikulocyter	— Partiell tromboplastintid

Klinisk kemi	
Glukos (*)	Alaninaminotransferas
Totalkolesterol	Aspartataminotransferas
Triglycerider	Alkaliskt fosfatas
Blodureakväve	Kalium
Total bilirubin	Natrium
Kreatinin	Kalcium
Totalprotein	Fosfor
Albumin	Klorid
Globulin	

Urinalys (valfritt)	
Utseende (färg och grumlighet)	Totalprotein
Volym	Glukos
Specifik vikt eller osmolalitet	Blod/blodceller
pH	

(*) Eftersom en lång fasteperiod kan införa partiskhet i glukosmätningar för de behandlade djuren jämfört med kontrolldjuren, bör försöksledaren avgöra om det är lämpligt att djuren fastar. Om man använder en fasteperiod bör den vara avpassad för den art som används, för råtta kan det vara 16 timmar (fastande över natten). Bestämning av fasteglukos kan utföras efter en natts fasta under den sista exponeringsveckan, eller efter en natts fasta innan obduktionen (i det senare fallet tillsammans med alla andra kliniska patologiska parametrar).

38. När det finns bevis på att de nedre luftvägarna (dvs. alveolerna) är den främsta platsen för deponering och lagring, då kan lungsköljning vara det tekniska valet för att kvantitativt analysera hypotesbaserade doseffektparametrar med fokus på alveolit, lunginflammation och fosfolipidos. Detta gör att dosrespons och tidsförloppsförändringar för alveolär skada grundligt kan undersökas. BAL-vätskan kan analyseras för totalt och differentiellt leukocytantal, totalprotein och laktatdehydrogenas. Andra parametrar som kan beaktas är de som tyder på lysosomal skada, fosfolipidos, fibros, och irriterande eller allergisk inflammation som kan innefatta bestämning av proinflammatoriska cytokiner/kemokiner. BAL-mätningar kompletterar i allmänhet resultaten från histopatologiska undersökningar, men kan dock inte ersätta dem. Vägledning om hur man utför lungsköljning finns i GD 39 (2).

▼M4

MAKROSKOPISK PATOLOGI OCH ORGANVIKTER

39. Samtliga försöksdjur, inklusive de som avlider under testet eller avlivas och tas bort från undersökningen av djurskyddsskäl, bör underkastas fullständig blodtömning (om möjligt) och obduceras. Tidsperioden mellan slutfasen av varje djurs exponering och avlivandet av dem ska registreras. Om en obduktion inte kan utföras omedelbart efter att ett dött djur påfunnits, bör djuret kylas (inte frysas) vid en temperatur som är tillräckligt låg för att minimera autolys. Obduktioner ska utföras så snart som möjligt, vanligtvis inom en dag eller två. Alla betydande patologiska förändringar bör registreras för varje djur med särskild uppmärksamhet på eventuella förändringar i luftvägarna.

40. Tabell 2 visar de organ och vävnader som bör bevaras i ett lämpligt medium under obduktion för histopatologisk undersökning. Bevarandet av organ och vävnader [inom hakparentes] och eventuellt andra organ och vävnader avgörs av försöksledaren. Organen i **fetstil** ska putsas och vägas våta så snart som möjligt efter dissektionen för att undvika uttorkning. Sköldkörteln och bitestiklarna bör endast vägas om det behövs, eftersom trimning av artefakter kan hindra en histopatologisk utvärdering. Vävnader och organ bör fixeras i 10 % buffrad formalin eller annat lämpligt fixativ så snart obduktionen utförts, och inte mindre än 24–48 timmar före trimning beroende på det fixativ som ska användas.

Tabell 2

Organ och vävnader som bevaras vid obduktion

Binjurar	Esofagus
Benmärg (och/eller färskt aspirat)	[Luktbulb]
Hjärna (inklusive delar av cerebrum, cerebellum och medulla/pons)	Äggstockar
(Ögon [retina, synnerv] och ögonlock)	Sädesblåsor
Hjärta	Ryggmärg (cervikala, mitt på bröstkorgen och ländryggen)
Njurar	**Mjälte**
Larynx (3 nivåer, 1 nivå för att inkludera basen på epiglottis)	Mage
Lever	**Testiklar**
Lungor (alla lober på en nivå, inklusive huvudbronker)	**Tymus**
Lymfkörtlar från lungans hilarregion, särskilt beträffande svårlösliga partikeltestkemikalier. För mer ingående undersökningar och/eller studier med immunologi i fokus kan ytterligare lymfkörtlar beaktas, t.ex. de från de mediastinala, cervikala/submandibulära och/eller aurikulära regionerna.	Sköldkörtel
	Luftstrupe (minst 2 nivåer inklusive 1 längdsnitt genom carina och 1 tvärsnitt)
	[Urinblåsa]
Nasofaryngeala vävnader (minst 4 nivåer; 1 nivå för att inkludera den nasofaryngeala kanalen och den nasalassocierade lymfvävnaden (NALT)	Uterus
	Alla större skador

▼M4

41. Lungorna bör avlägsnas intakta, vägas och indränkas med lämpligt fixativ vid ett tryck på 20–30 cm vatten för att säkerställa att lungstrukturen bibehålls (5). Sektioner bör samlas in för alla lober på en nivå, inklusive huvudbronker, men om lungsköljning utförs ska den osköljda loben sektioneras på tre nivåer (ej seriella sektioner).

42. Minst 4 nivåer av de nasofaryngeala vävnaderna bör undersökas, varav en ska innehålla den nasofaryngeala kanalen, (5, 6, 7, 8, 9) för en adekvat undersökning av den skvamösa, mellanliggande (icke-cilierade respiratoriska), respiratoriska (cilierade respiratoriska) och luktepitelet, samt den dränerade lymfvävnaden (NALT; 10, 11). Tre nivåer av struphuvudet bör undersökas, och en av dessa nivåer bör inkludera struplockets bas (12). Minst två nivåer av luftstrupen bör undersökas, inklusive ett längdsnitt genom förgreningen av carinan för de extrapulmonella bronkerna, samt ett tvärsnitt.

HISTOPATOLOGI

43. En histopatologisk utvärdering av alla organ och vävnader som räknas upp i tabell 2 bör utformas för kontroll- och högkoncentrationsgrupperna och för alla djur som dör eller avlivas under studien. Särskild uppmärksamhet bör ges åt luftvägarna, målorganen och större skador. Organ och vävnader som har skador i högkoncentrationsgruppen bör undersökas i alla grupper. Försöksledaren kan välja att utföra histopatologiska utvärderingar av flera grupper för att påvisa en tydlig koncentrationsrespons. Om en satellitgrupp (reversibilitet) används bör en histopatologisk utvärdering göras av samtliga vävnader och organ där effekter visats i de behandlade grupperna. Om det finns alltför många tidiga dödsfall eller andra problem i högkoncentrationsgruppen som äventyrar datans signifikans, bör nästa lägre koncentration undersökas histopatologiskt. Ett försök bör göras att korrelera större observationer i relation till mikroskopiska fynd.

DATA OCH RAPPORTERING

Data

44. Individuella data om djurens kroppsvikt, födointag, klinisk patologi, makroskopisk patologi, organvikter och histopatologi ska lämnas. Kliniska observationsdata bör sammanfattas i tabellform, som för varje testgrupp visar antalet djur som använts, antalet djur som visar tecken på toxicitet, antalet djur som avlidit under testet eller som avlivats av humanitära skäl, tidpunkten då det enskilda djuret har avlidit, beskrivning och tidsförlopp för toxiska verkningar och reversibilitet, samt obduktionsfynd. Samtliga resultat, kvantitativa och tillfälliga, ska utvärderas genom en lämplig statistisk metod. En allmänt vedertagen statistisk metod kan användas, och statistiska metoderna bör väljas under studiens utformning.

Testrapport

45. Testrapporten ska omfatta följande information, när så är lämpligt:

Försöksdjur och djurhållning

— Beskrivning av burförhållanden, inklusive antal (eller förändring av antal) djur per bur, strö, omgivningstemperatur och relativ fuktighet, ljusperiod och identifiering av kost.

▼M4

— Art/stam som används och motivering för att använda andra arter än råtta. Källor och historiska data kan ges om de kommer från djur som har exponerats under liknande exponering, inhysning och fastebetingelser.

— Djurens antal, ålder och kön.

— Metod för randomisering.

— Beskrivning av eventuella förtestbetingelser inbegripet kost, karantän och behandling av sjukdomar.

Testkemikalie

— Fysikalisk natur, renhet och, i förekommande fall, fysikalisk-kemiska egenskaper (inbegripet isomerisering).

— Identifieringsdata och CAS-nummer (Chemical Abstract Services), om detta är känt.

Vehikel

— Motivering för användning av vehikel och valet av vehikel (om annat än vatten).

— Historiska eller parallella data som visar att vehikeln inte påverkar studiens slutresultat.

Inhalationskammare

— Detaljerad beskrivning av inhalationskammaren inklusive volym och ett diagram.

— Ursprung och beskrivning av utrustning som används för exponering av djur så väl som generering av atmosfären.

— Utrustning för mätning av temperatur, fuktighet, partikelstorlek och faktisk koncentration.

— Luftkälla och system som används för konditionering.

— Metoder som används för kalibrering av utrustning för att säkerställa en homogen testatmosfär.

— Tryckskillnad (positiv eller negativ).

— Exponeringsportar per kammare (enbart nos), placering av djur i kammaren (helkropp).

— Testatmosfärens stabilitet.

— Placering av temperatur- och fuktighetsgivare och provtagning av testatmosfären i kammaren.

— Behandling av luft som tillförs/extraheras.

— Luftflödeshastigheter, port för luftflöde och exponering (enbart nos), eller djurbelastning och kammare (helkropp).

— Tid tills inhalationskammaren har nått jämvikt (t95).

— Antal volymutbyten per timme.

— Mätutrustning (i förekommande fall).

Exponeringsdata

— Grund för valet av målkoncentration i huvudstudien.

▼M4

— Nominella koncentrationer (den totala massan av testkemikalien som genereras i inhalationskammaren dividerad med luftvolymen som passerar genom kammaren).

— Faktiska koncentrationer av testkemikalien som uppsamlats från djurens andningsapparat, för blandningar som bildar heterogena fysikaliska former (gaser, ångor, aerosoler), där var och en analyseras separat.

— Alla luftkoncentrationer bör redovisas i massenheter (mg/l mg/m^3, etc.) snarare än volymenheter (ppm, ppb, etc.).

— Partikelstorleksfördelning, aerodynamisk massmediandiameter (MMAD) och geometrisk standardavvikelse (σ_g), inklusive metoderna för deras beräkning. Individuella partikelstorleksanalyser bör rapporteras.

Testbetingelser

— Uppgifter om testkemikalieberedning, inklusive uppgifter om eventuella procedurer som använts för att minska partikelstorlekarna hos fasta ämnen eller för att bereda testlösningar.

— En beskrivning (helst med ett diagram) av utrustningen som används för att generera testatmosfären och för att exponera djuren för denna atmosfär.

— Uppgifter om den utrustning som används för att övervaka kammarens temperatur, fuktighet och luftflöde (dvs. utarbetningen av en kalibreringskurva).

— Uppgifter om den utrustning som används för att samla in prover för bestämning av kammarens koncentration och partikelstorleksfördelning.

— Uppgifter om den kemiska analysmetod som används och metodvalidering (inklusive effektiviteten för återvinningen av testkemikalien från provtagningsmediet).

— Metod för randomisering av djur till test- och kontrollgrupper.

— Uppgifter om foder- och vattenkvalitet (inbegripet kosttyp/-källa och vattenförsörjning).

— Grunden för valet av testkoncentration.

Resultat

— Tabelluppställning av kammarens temperatur, fuktighet och luftflöde.

— Tabelluppställning av kammarens nominella och faktiska koncentrationsdata.

— Tabelluppställning av partikelstorleksdata som omfattar provtagningsdata, partikelstorleksfördelning och beräkning av MMAD och σ_g.

— Tabelluppställning av responsdata och koncentrationsnivåer för varje djur (dvs. djur som uppvisar tecken på toxicitet inklusive mortalitet, natur, allvarlighetsgrad, tidpunkt för första tecknet och effekternas varaktighet).

▼M4

— Tabelluppställning av de enskilda djurens vikt.

— Tabelluppställning av födointag.

— Tabelluppställning av kliniska patologiska data.

— Obduktionsfynd och histopatologiska fynd för varje djur, om detta finns tillgängligt.

— Tabelluppställning av eventuella andra uppmätta parametrar.

Diskussion och tolkning av resultaten

— Särskild uppmärksamhet bör ges till beskrivningen av metoderna som används för att uppfylla kriterierna för denna testmetod t.ex. koncentrationsgräns eller partikelstorlek.

— Partiklarnas andningsbarhet i ljuset av de övergripande resultaten bör behandlas, särskilt om kriterierna för partikelstorlek inte kunde uppfyllas.

— Överensstämmelsen mellan metoderna som används för att bestämma nominell och faktisk koncentration, och förhållandet mellan faktisk och nominell koncentration bör ingå i den samlade bedömningen av studien.

— Den sannolika dödsorsaken och dominerande verkningsmekanism (systematisk mot lokal) bör behandlas.

— En förklaring bör ges om det fanns behov av att avliva djur, som visade tecken på uppenbar smärta eller svårt och ihållande lidande, av humanitära skäl på grundval av kriterierna i OECD:s vägledningsdokument om humana endpoints (3).

— Målorganet(en) bör identifieras.

— NOAEL och LOAEL bör bestämmas.

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 and Ward JM (eds) Carcinogenesis. Target Organ Toxicology Series, Raven Press, New York, 215–263.

(9) Mery S, Gross EA, Joyner DR, Godo M, Morgan KT (1994). Nasala diagram: 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) Europaparlamentets och rådets förordning (EG) nr 1272/2008 av den 16 december 2008 om klassificering, märkning och förpackning av ämnen och blandningar, ändring och upphävande av direktiven 67/548/EEG och 1999/45/EG samt ändring av förordning (EG) nr 1907/2006 (Text av betydelse för EES), EUT L 353, 31.12.2008, s. 1.

▼**M4**

Tillägg 1

DEFINITION

Testkemikalie: Alla ämnen eller blandningar som testas med denna testmetod.

▼B

B.9 **TOXICITET VID UPPREPAD DOSERING (28 DAGAR, DERMALT)**

1. **METOD**

1.1 INLEDNING

Se allmän inledning till del B (A).

1.2 DEFINITIONER

Se allmän inledning till del B (B).

1.3 REFERENSÄMNEN

Inga.

1.4 TESTMETODSPRINCIP

Testämnet appliceras dagligen i graderade doser på huden till flera grupper av försöksdjur, varvid varje grupp ges en bestämd dos i 28 dagar. Under appliceringsperioden observeras djuren dagligen för tecken på toxicitet. Djur som dör under testet obduceras, och i slutet av testet avlivas och obduceras de överlevande djuren.

1.5 KVALITETSKRITERIER

Inga.

1.6 METODBESKRIVNING

1.6.1 **Förberedelser**

I minst fem dagar före testet ska djuren hållas under testbetingelser med hänsyn till miljö och utfodring. Före testet fördelas friska unga djur slumpmässigt i behandlings- och kontrollgrupper. Omedelbart innan testet inleds ska päls klippas bort från försöksdjurens rygg. Om pälsen rakas bort ska detta göras ungefär 24 timmar före testet. Klippning eller rakning behöver vanligtvis upprepas ungefär en gång i veckan. När pälsen klipps eller rakas bort ska försiktighet iakttas så att huden inte skadas. Minst 10 % av kroppsytan ska göras klar för applicering av testämnet. Vid fastställande av vilket och hur stort område som ska förberedas ska hänsyn tas till djurets kroppsvikt. Vid test av fasta ämnen, som får pulvriseras om det är lämpligt, ska testämnet fuktas tillräckligt med vatten eller, vid behov med lämplig vehikel, för att säkerställa god kontakt med huden. Flytande testämnen används vanligen outspädda. Testämnet appliceras dagligen fem till sju dagar i veckan.

1.6.2 **Testbetingelser**

1.6.2.1 *Försöksdjur*

Könsmogna råttor, kaniner eller marsvin får användas. Andra arter kan användas men i så fall ska detta motiveras.

▼B

Vid testets början får vikten hos de aktuella djuren inte avvika mer än ± 20 % från en rimlig genomsnittsvikt.

1.6.2.2 *Antal och kön*

Minst 10 djur (fem honor och fem hanar) med frisk hud ska användas på varje dosnivå. Honorna får inte ha fött ungar och får inte vara dräktiga. Vid planenligt avlivande av djur under testet ska det ursprungliga antalet djur ökas med det antal djur som planenligt ska avlivas innan studien slutförs. Dessutom kan en satellitgrupp bestående av 10 djur (fem av vardera könet) tillföras den högsta dosnivån i 28 dagar och därefter observeras i 14 dagar efter testet för reversibilitet, persistens eller fördröjt uppträdande av toxiska effekter. Även en satellitgrupp bestående av 10 kontrolldjur (fem av vardera könet) ska användas.

1.6.2.3 *Dosnivåer*

Till testet ska användas minst tre dosnivåer samt en kontrollgrupp eller en vehikelkontroll, om vehikel används. Testämnet ska appliceras vid samma tid varje dag och dosnivåerna ska justeras med jämna mellanrum (varje eller varannan vecka) så att dosnivån hålls konstant i förhållande till djurens kroppsvikt. Djuren i kontrollgruppen ska behandlas på samma sätt som djuren i behandlingsgruppen, bortsett från att de inte ska tillföras testämnet. Om vehikel används för att underlätta dosering ska kontrollgruppen tillföras vehikeln på samma sätt som behandlingsgrupperna. Vidare ska vehikeln tillföras kontrollgruppen i samma mängd som till de försöksdjur i gruppen som ges den högsta dosnivån. Den högsta dosnivån ska ge toxiska effekter men inga eller få dödsfall. Den lägsta dosnivån ska inte ge några tecken på toxicitet. Om det finns en användbar uppskattning av människans exponering för ämnet ska den lägsta nivån vara högre än denna. Helst ska medeldosen ge minsta möjliga observerbara toxiska effekter. Om fler än en medeldos används ska dosnivåerna väljas på ett sådant sätt att en gradering av de toxiska effekterna erhålls. I grupperna som utsätts för låg- och medeldoser och i kontrollgruppen ska antalet dödsfall hållas på en låg nivå för att utvärderingen av resultaten ska vara meningsfylld.

Om appliceringen av testämnet ger allvarlig hudirritation ska koncentrationerna sänkas, vilket kan medföra att andra toxiska effekter minskar eller uteblir på högsta dosnivån. Om huden har skadats allvarligt kan det bli nödvändigt att avsluta det pågående testet och påbörja en ny med lägre koncentrationer.

1.6.2.4 *Gränstest*

Om det vid ett förberedande test fastställs att en dosnivå på 1 000 mg/kg, eller en högre dosnivå om detta motiveras av kunskap om människans möjliga exponering, inte ger några toxiska effekter kan ytterligare test anses vara överflödiga.

1.6.2.5 *Observationsperiod*

Försöksdjuren ska observeras dagligen för tecken på toxicitet. Tidpunkten för dödsfall och tidpunkten då tecken på toxicitet uppträder ska registreras.

▼B

1.6.3 **Förfarande**

Djuren ska hållas i var sin bur. Den ideala doseringen är att djuren utsätts för testämnet sju dagar i veckan i 28 dagar. Djur i en eventuell satellitgrupp som planerats för uppföljning ska observeras i ytterligare 14 dagar utan tillförsel av testämnet så att det kan fastställas om de toxiska effekterna försvinner eller om de håller i sig. Exponeringstiden ska vara minst sex timmar per dag.

Testämnet ska appliceras jämnt över ett område som motsvarar ungefär 10 % av den totala kroppsytan. Med starkt toxiska ämnen kan testområdet vara mindre men så stor del av området som möjligt ska täckas med ett så tunt och jämnt fördelat lager som möjligt.

Under exponeringen ska testämnet hållas i kontakt med huden med en porös kompress och icke hudirriterande tejp. Testområdet ska vidare täckas på lämpligt sätt så att gaskompressen och testämnet hålls på plats och djuren inte kan inta testämnet. För att förhindra intag av testämnet kan rörelsehindrande anordningar användas men total immobilisering rekommenderas inte. Alternativt kan en ”skyddskrage” användas.

I slutet av exponeringsperioden ska kvarvarande testämne avlägsnas, om så är lämpligt med användning av vatten eller någon annan passande metod att rengöra huden.

Alla djuren ska observeras dagligen och tecken på toxicitet ska registreras tillsammans med tidpunkten då de uppträdde samt graden och varaktigheten av toxiciteten. Observationer ska omfatta hud- och pälsförändringar, ögon och slemhinnor och även respirations- och cirkulationssystem, autonoma och centrala nervsystemet samt kroppsmotorik och beteendemönster. Djurens ska vägas varje vecka och vidare rekommenderas att foderförbrukningen mäts per vecka. Det är nödvändigt att observera djuren regelbundet för att säkerställa att så få djur som möjligt faller bort från studien till följd av kannibalism, autolys av vävnader eller förväxling. I slutet av testet avlivas och obduceras alla överlevande djur utom djuren i satellitgruppen. Djur som dör under testet obduceras, och i slutet av testet avlivas och obduceras de överlevande djuren.

I slutet av testet ska alla djur inklusive kontrollgruppen genomgå följande undersökning:

1. Hematologi omfattande minst hematokrit, hemoglobinkoncentration, erytrocyträkning, total och differential räkning av leukocyter samt mätning av koaguleringsförmågan.

2. Klinisk biokemisk analys av blodet omfattande minst en lever- och njurfunktionsparameter: alanin-aminotransferas (tidigare kallat glutaminsyra-pyrodruvsyra-transaminas, GPT), serum-aspartat-aminotransferas (tidigare kallat glutaminsyra-oxalättiksyra-transaminas, GOT), och urinäkväve, äggviteämnen, blod-kreatinin, totalt bilirubin och totalt serumprotein.

Andra bestämningar som kan vara nödvändiga för en adekvat toxikologisk utvärdering är kalcium, fosfor, klorid, natrium, kalium, glukos efter fasta, lipidanalys, hormoner, syra/basbalansen, metahemoglobin och kolinesterasaktivitet.

▼B

Ytterligare kliniska biokemiska analyser kan vid behov utföras för att vidare utreda de observerade effekterna.

1.6.4 **Makroskopisk undersökning**

Alla försöksdjur ska genomgå en fullständig makroskopisk undersökning. Lever, njurar, binjurar och testiklar ska vägas våta så snart som möjligt efter dissektion för att undvika uttorkning. Organ och vävnader, dvs. obehandlad och behandlad hud, lever, njure, mjälte, testiklar, binjurar, hjärta och målorgan (de organ som företer allvarliga skador eller storleksförändringar) ska förvaras i lämpligt medium för eventuell senare histopatologisk undersökning.

1.6.5 **Histopatologisk undersökning**

Histologisk undersökning ska göras av bevarade organ och vävnader från högdosgruppen och kontrollgruppen. Organ och vävnader, hämtade från gruppen som fått den högsta dosnivån, som uppvisar defekter som kan tillskrivas testämnet, ska undersökas i alla grupper som fått lägre dos. Djur i satellitgruppen ska genomgå histologisk undersökning, särskilt de organ och vävnader som har utvisat effekter i de övriga behandlingsgrupperna.

2. **DATA**

Data ska ställas upp i tabellform och för varje behandlingsgrupp anges antal djur i början av testet och antal djur som företer varje typ av skada.

Alla observerade resultat ska utvärderas med lämplig statistisk metod. Alla vedertagna statistiska metoder kan användas.

3. **RAPPORTERING**

3.1 TESTRAPPORT

Testrapporten ska om möjligt innehålla följande uppgifter:

— Data om djuren (art, stam, härkomst, miljöbetingelser, foder osv.).

— Testbetingelser (inklusive slag av bandage: med eller utan ocklusion).

— Dosnivåer (inklusive vehikel, om sådan använts) och koncentrationer.

— Uppgifter om toxisk reaktion uppdelade efter kön och dos.

— Icke toxisk dos, om sådan har fastställts.

— Tidpunkten för dödsfall under testet eller överlevnad till slutet av testet.

— Toxiska och andra effekter.

— Tidpunkten för observation av varje abnormt tecken och dess senare utveckling

— Uppgifter om foder och kroppsvikt.

— Hematologiska undersökningar och alla resultat.

▼B

— Kliniska biokemiska analyser och alla resultat.

— Obduktionsfynd.

— Detaljerad beskrivning av alla histopatologiska fynd.

— Statistisk behandling av resultaten i lämpliga fall.

— Diskussion om resultaten.

— Tolkning av resultaten.

3.2 UTVÄRDERING OCH TOLKNING

Se allmän inledning till del B (D).

4. **HÄNVISNINGAR**

Se allmän inledning till del B (E).

▼M7

B.10 TEST IN VITRO AV KROMOSOMAVVIKELSER HOS DÄGGDJUR

INLEDNING

Den här testmetoden motsvarar OECD:s testriktlinje 473 (2016). Det är en del av en serie av testmetoder för genetisk toxikologi. Ett OECD-dokument som ger kortfattad information om tester inom genetisk toxikologi och en översikt över de senaste ändringarna av dessa testriktlinjer har utarbetats (1).

Syftet med test in vitro av kromosomavvikelser hos däggdjur är att identifiera kemikalier som orsakar strukturella kromosomavvikelser hos odlade däggdjursceller (2) (3) (4). Strukturella avvikelser kan vara av två typer, kromosomala eller kromatida. Polyploidi (inklusive endoreduplicering) kan uppstå vid tester av kromosomavvikelser in vitro. Aneugener kan framkalla polyploidi, men enbart polyploidi tyder inte på aneugen potential, och kan helt enkelt tyda på störningar i cellcykeln eller cytotoxicitet (5). Detta test är inte utformat för att mäta aneuploidi. Mikrokärntest in vitro (6) rekommenderas för detektering av aneuploidi.

Test av kromosomavvikelser in vitro kan göras med kulturer av etablerade cellinjer eller primära cellkulturer från människor eller gnagare. De celler som används bör väljas ut på grundval av tillväxtförmåga vid odling, karyotypens stabilitet (inklusive antalet kromosomer) och den spontana frekvensen av kromosomavvikelser (7). De uppgifter som finns tillgängliga för närvarande tillåter inte bestämda rekommendationer, men de tyder på att det i utvärderingen av kemiska faror är viktigt att överväga p53-status, genetisk stabilitet (karyotyp) samt DNA-cellernas återhämtningskapacitet och ursprung (gnagare jämfört med människa) hos de celler som väljs ut för testning. Om denna testmetod används bör man överväga hur dessa och andra cellegenskaper inverkar på cellinjen för att upptäcka kromosomavvikelser, allteftersom kunskapen utvecklas på detta område.

Definitioner av begreppen finns i tillägg 1.

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN OCH BEGRÄNSNINGAR

För testning in vitro krävs i regel ett exogent system för metabolisk aktivering, om cellerna inte är metaboliskt kompetenta i fråga om de ämnen som testas. Det exogena metaboliska aktiveringssystemet efterliknar inte helt förhållandena in vivo. Man bör också se till att undvika sådana förhållanden som leder till artefaktiska positiva resultat, dvs. kromosomskador som inte är orsakade av direkt samverkan mellan testkemikalierna och kromosomerna. Sådana förhållanden kan vara ändringar av pH eller osmolalitet (8) (9) (10), samverkan mellan mediets komponenter (11) (12) eller för hög cytotoxicitet (13) (14) (15) (16).

Detta test används för att detektera kromosomavvikelser som kan utlösas av klastogena händelser. Analysen av induktion av kromosomavvikelser bör göras med hjälp av celler i metafas. Det är därför viktigt att mitos har inträffat i både de behandlade och obehandlade odlingarna. Tillverkade nanomaterial kan kräva särskilda anpassningar av testmetoden, men de beskrivs inte här.

Innan testmetoden används på en blandning i syfte att samla in data för ett lagstadgat ändamål bör man överväga om, och i så fall varför, den kommer att ge godtagbara resultat för det syftet. Sådana överväganden är inte nödvändiga om blandningen måste provas enligt lag.

▼M7

TESTPRINCIP

Cellodlingar från människa eller däggdjur exponeras för testkemikalien både med och utan exogent metaboliskt aktiveringssystem, utom om de celler som används har tillräcklig metaboliserande kapacitet (se punkt 13). Vid lämpliga förutbestämda intervall, efter det att cellodlingen har exponerats för testkemikalien, utförs behandling med ett ämne som stoppar celldelningen i metafas (t.ex. colcemid eller colchicin). Därefter skördas cellerna och färgas in, varpå närvaro av kromatid- och kromosomavvikelser i metafascellerna analyseras mikroskopiskt.

BESKRIVNING AV TESTMETODEN

Förberedelser

Celler

En mängd olika cellinjer kan användas (t.ex. äggstocksceller från kinesisk hamster (CHO), lungceller från kinesisk hamster V79, lungceller från kinesisk hamster (CHL)/IU, TK6) eller primära cellodlingar, inklusive perifera blodlymfocyter från människa eller andra däggdjur (7). Valet av använda cellinjer bör vara vetenskapligt motiverat. Om primära celler används av djurskyddsskäl bör man när så är möjligt överväga användning av primära celler med mänskligt ursprung som samlas in enligt humana etiska principer och föreskrifter. Humana perifera blodlymfocyter bör tas från unga rökfria personer (cirka 18–35 år) utan kända sjukdomar som inte nyligen har exponerats för genotoxiska läkemedel (t.ex. kemikalier, joniserande strålning) vid nivåer som skulle öka den bakomliggande incidensen av kromosomavvikelser. Detta garanterar att den bakomliggande incidensen av kromosomavvikelser är låg och konstant. Förekomsten av kromosomavvikelser ökar med åldern och denna tendens är mer markerad hos kvinnor än hos män (17) (18). Om celler från fler än en givare poolas för användning bör antalet givare anges. Man måste kunna påvisa att cellerna har delat sig från det att behandlingen med testkemikalien påbörjades fram till provtagningen av cellerna. Cellodlingarna hålls i en exponentiell celltillväxtfas (cellinjer) eller stimuleras så att de delar sig (primära lymfocytodlingar). Syftet med detta är att exponera cellerna i olika stadier av cellcykeln eftersom cellstadiernas känslighet för testkemikalierna kanske inte är känd. De primära celler som måste stimuleras med mitogena medel för att dela sig är i regel inte längre synkroniserade under exponeringen för testkemikalien (t.ex. humana lymfocyter efter mitogenisk stimulans i 48 timmar). Användning av synkroniserade celler under behandling rekommenderas inte, men kan vara godtagbar om det är motiverat.

Medier och odlingsbetingelser

Lämpliga odlingsmedier och inkubationsförhållanden (odlingskärl, luftfuktighet på 5 % CO_2 i förekommande fall, inkubationstemperatur på 37 °C) bör väljas för odlingarna. Etablerade cellinjer och stammar bör rutinmässigt kontrolleras med avseende på det modala kromosomantalets stabilitet och frånvaro av kontaminerad mykoplasma (7) (19), och får inte användas om kontamination har skett eller om det modala kromosomantalet har ändrats. Cellernas normala cellcykeltid eller den normala cellcykeltiden hos de primära kulturer som används i testlaboratoriet bör fastställas och bör överensstämma med kända cellegenskaper (20).

Beredning av odlingarna

Cellinjer: celler förökas från stamkulturer, sås ut i ett odlingsmedium som har en sådan densitet att celler i suspension eller monolager fortsätter att växa exponentiellt fram till skörd (konfluens av celler som växer i monolager bör undvikas).

▼M7

Lymfocyter: helblod, behandlat med en antikoagulant (t.ex. heparin} eller så odlas separerade lymfocyter (t.ex. 48 timmar för humana lymfocyter) i närvaro av en mitogen [t.ex. fytohemaglutinin (PHA) för humana lymfocyter] för att framkalla celldelning innan cellerna exponeras för testkemikalien.

Metabolisk aktivering

Exogena metaboliserande system bör användas när cellerna inte har tillräcklig endogen metabolisk kapacitet. Det mest använda systemet, som rekommenderas som standard om inte annat kan motiveras, är en kofaktorstödd post-mitokondriell fraktion (S9) beredd ur lever från gnagare (vanligen råttor) som behandlats med enzyminducerande ämnen såsom Aroclor 1254 (21) (22) (23) eller en kombination av fenobarbital och β-naftoflavon (24) (25) (26) (27) (28) (29). Den senare kombinationen bryter inte mot Stockholmkonventionen om långlivade organiska föroreningar (30) och har visat sig vara lika effektiv som Aroclor 1254 när det gäller att inducera monooxygenaser (”mixed-function oxidases”) (24) (25) (26) (28). S9-fraktionen används vanligen i koncentrationer mellan 1–2 volymprocent men kan ökas till 10 volymprocent i det slutliga testmediet. Användning av produkter som minskar det mitotiska indexet, särskilt kalciumkomplexprodukter (31), bör undvikas under behandlingen. Valet av typ och koncentration av använt exogent metaboliskt aktiveringssystem eller metabolisk induktion kan påverkas av den kemikalieklass som testas.

Beredning av testkemikalien

Fasta testkemikalier bör lösas upp i eller blandas med lämpliga lösningsmedel eller vehiklar och vid behov spädas ut innan cellerna behandlas (se punkt 23). Flytande testkemikalier kan tillsättas direkt till testsystemet och/eller spädas ut före behandling av testsystemet. Gaser eller flyktiga testkemikalier bör testas genom lämpliga modifikationer av standardprotokollen, såsom behandling i slutna odlingskärl (32) (33) (34). Testkemikalien bör beredas strax innan behandling om inte stabilitetsdata visar att lagringen är acceptabel.

Testbetingelser

Lösningsmedel

Man bör välja ett lösningsmedel som optimerar testkemikaliens löslighet utan att testet påverkas negativt, t.ex. genom förändringar i celltillväxten som påverkar testkemikaliens integritet, reaktion med odlingskärlen eller försämrad metabolisk aktivering. När det är möjligt, rekommenderas att man i första hand överväger vattenbaserade lösningsmedel (eller odlingsmedier). Vedertagna lösningsmedel är till exempel vatten eller dimetylsulfoxid. Generellt bör organiska lösningsmedel inte överstiga 1 volymprocent och vattenhaltiga lösningsmedel (saltlösningar eller vatten) bör inte överstiga 10 volymprocent i det slutliga behandlingsmediet. Om man använder lösningsmedel som inte är vedertagna (t.ex. etanol eller aceton) bör detta stödjas av uppgifter om att de är förenliga med testkemikalierna och testsystemet och att de inte är genetiskt toxiska vid den använda koncentrationen. Om ett sådant underlag saknas är det viktigt att inkludera obehandlade kontroller (se tillägg 1) som påvisar att inga skadliga eller klastogena effekter induceras av det valda lösningsmedlet.

Mätning av cellproliferation och cytotoxicitet och val av exponeringskoncentrationer

Vid bestämning av den högsta testkemikaliekoncentrationen bör man undvika koncentrationer som kan ge artefaktiska positiva resultat, t.ex. för kraftig cytotoxicitet (se punkt 22), utfällning i odlingsmediet (se punkt 23) eller markerade ändringar av pH eller osmolalitet (se punkt 5). Om testkemikalien orsakar en

▼M7

markerad ändring av pH i mediet vid tillsättningstidpunkten kan pH justeras, företrädesvis genom buffring av det slutliga behandlingsmedlet för att undvika artefaktiska positiva resultat och upprätthålla lämpliga odlingsförhållanden.

Cellproliferationen bör mätas för att se till att ett tillräckligt antal behandlade celler har nått mitos under försöket och att behandlingarna görs på lämpliga nivåer av cytotoxicitet (se punkterna 18 och 22). Cytotoxicitet bör fastställas med och utan metabolisk aktivering i huvudförsöket med hjälp av lämplig indikation på celldöd och tillväxt. Även om det kan vara användbart att utvärdera cytotoxicitet i ett preliminärt test för att bättre definiera de koncentrationer som ska användas i huvudförsöket är ett preliminärt test inte obligatoriskt. Om ett preliminärt test utförs bör det inte ersätta mätning av cytotoxicitet i huvudförsöket.

Relativ populationsfördubblingstid (RPD) eller relativ ökning av celltal (RICC) är lämpliga metoder för bedömning av cytotoxicitet i cytogenetiska tester (13) (15) (35) (36) (55) (se tillägg 2 för formler). Om behandlings- och provtagningstiderna är långa efter det att behandlingen inletts kan cellcykellängder som är längre än 1,5 normala cellcykellängder (dvs. längre än totalt tre cellcykellängder) leda till en underskattning av cytotoxiteten om RPD används (37). Under dessa omständigheter kan RICC vara ett bättre mått. RPD kan dock även vara användbart för att utvärdera utvecklingen av cytotoxicitet efter 1,5 normala cellcykellängder.

När det gäller lymfocyter i primära odlingar är mitotiskt index (MI) ett mått på cytotoxiska/cytostatiska verkningar. Det påverkas dock av mätningstidpunkten efter behandling, använt mitogen och eventuella störningar i cellcykeln. MI är dock godtagbart eftersom andra cytotoxiska mätningar kan vara besvärliga och opraktiska och kanske inte går att använda för målpopulationen av lymfocyter som växer till följd av PHA-stimulering.

Rekommenderade cytotoxicitetsparametrar är således RICC och RPD för cellinjer och MI för primära odlingar av lymfocyter. Andra indikatorer (t.ex. cellintegritet, apoptos, nekros och cellcykel) kan ge värdefull kompletterande information.

Minst tre testkoncentrationer (exklusive lösningsmedel och positiva kontroller) som uppfyller acceptanskriterierna (lämplig cytotoxicitet, antal celler osv.) bör utvärderas. Oavsett celltyp (cellinjer eller primära odlingar av lymfocyter) kan antingen replikat eller enstaka behandlade kulturer användas för varje testad koncentration. Två identiska kulturer rekommenderas, men enstaka kulturer är också godtagbara under förutsättning att samma totala antal celler registreras för enstaka som för dubbla kulturer. Användning av enstaka kulturer är särskilt relevant när fler än tre koncentrationer utvärderas (se punkt 31). De resultat som erhölls i de oberoende replikatodlingarna vid en given koncentration kan slås ihop för dataanalysen (38). För testkemikalier med låg eller ingen cytotoxicitet är två- till trefaldiga koncentrationsintervall vanligen lämpliga. Om testkemikalien är cytotoxisk bör de valda testkoncentrationerna täcka ett relevant intervall för cytotoxiciteten enligt beskrivningen i punkt 22 och omfatta koncentrationer med måttlig, låg eller ingen cytotoxicitet. Många testkemikalier uppvisar branta koncentrations-reponskurvor. För att få uppgifter vid låg och måttlig

▼M7

cytotoxicitet eller undersöka dos-responsförhållandet i detalj är det därför nödvändigt att använda mera näraliggande koncentrationer och/eller fler än tre koncentrationer (enstaka kulturer eller replikat) i situationer där försöket måste upprepas (se punkt 47).

Om den maximala koncentrationen baseras på cytotoxicitet bör den högsta koncentrationen syfta till att uppnå 55 ± 5 % cytotoxicitet med hjälp av de rekommenderade cytotoxicitetsparametrarna (dvs. minskning av RICC och RPD för cellinjer och minskning av MI för primära odlingar av lymfocyter till 45 ± 5 % av den parallella negativa kontrollen). Man bör vara försiktig i tolkningen av positiva resultat som endast återfinns i den övre delen av detta cytotoxicitetsintervall på 55 ± 5 % (13).

För svårlösliga testkemikalier som inte är cytotoxiska vid koncentrationer som är lägre än den lägsta olösliga koncentrationen bör den högsta analyserade koncentrationen framkalla grumlighet eller en fällning som är synlig med blotta ögat eller med hjälp av ett inverterat mikroskop vid slutet av behandlingen med testkemikalien. Även om cytotoxicitet förekommer över den lägsta olösliga koncentrationen är det lämpligt att testa endast en koncentration som producerar grumlighet eller har en synlig fällning, eftersom fällningen kan ge artefaktiska effekter. När det gäller koncentrationer som ger fällningar bör man se till att detta inte stör testet (t.ex. färgning eller bestämning). Bestämning av löslighet i odlingsmediet före försöket kan vara användbart.

Om ingen fällning eller begränsande cytotoxicitet observeras ska de högsta testkoncentrationerna motsvara 10 mM, 2 mg/ml eller 2 µl/ml, enligt det som är lägst (39) (40) (41). Om testkemikalien inte har en definierad sammansättning, t.ex. ett ämne med okänd eller variabel sammansättning, komplexa reaktionsprodukter eller biologiskt material (UVCB) (42), miljöextrakt osv., kan man behöva använda en högre toppkoncentration (t.ex. 5 mg/ml) om inte cytotoxiciteten är tillräckligt hög, för att öka koncentrationen för varje komponent. Det bör dock noteras att dessa krav kan skilja sig för humanläkemedel (43).

Kontroller

Parallella negativa kontroller (se punkt 15), bestående av enbart lösningsmedel i behandlingsmediet, och hanterade på samma sätt som behandlingsodlingarna, bör inkluderas varje gång odlingen skördas.

Parallella positiva kontroller behövs för att visa laboratoriets förmåga att identifiera klastogener enligt villkoren i det använda testprotokollet och, i förekommande fall, effektiviteten hos det exogena systemet för metabolisk aktivering. Exempel på positiva kontroller ges i tabell 1 nedan. Alternativa positiva kontrollkemikalier kan användas om det är motiverat. Tester av däggdjursceller in vitro för genetisk toxicitet är tillräckligt standardiserade och de positiva kontrollerna kan därför begränsas till en klastogen som kräver metabolisk aktivering. Förutsatt att denna enstaka positiva kontrollrespons görs samtidigt med det icke-aktiverade testet och med samma behandlingslängd kommer den att visa både aktiviteten hos det metaboliska aktiveringssystemet och testsystemets responsivitet. Separata positiva kontroller bör dock göras av långvariga behandlingar (utan S9) eftersom behandlingstiden skiljer sig från tester med metabolisk aktivering. Varje positiv kontroll bör användas för en eller flera koncentrationer som förväntas ge ökningar över bakgrunden som går att reproducera och detektera. Syftet med detta är att visa testsystemets känslighet (dvs. verkningarna är tydliga men avslöjar inte omedelbart identiteten hos de kodade utstryksglasen för avläsaren), och responsen får inte äventyras av cytotoxicitet som överskrider de gränser som anges i testmetoden.

▼M7

Tabell 1

Rekommenderade referenskemikalier för utvärdering av laboratoriets kompetens att välja positiva kontroller.

Kategori	Kemikalie	CASRN
1. Klastogener utan metabolisk aktivering		
	Metylmetansulfonat	66-27-3
	Mitomycin C	50-07-7
	4-nitrokinolin-N-oxid	56-57-5
	Cytosinarabinosid	147-94-4
2. Klastogener som kräver metabolisk aktivering		
	Benso(a)pyren	50-32-8
	Cyklofosfamid	50-18-0

FÖRFARANDET

Behandling med testkemikalien

Prolifererande celler behandlas med testkemikalien i såväl närvaro som frånvaro av ett system för metabolisk aktivering.

Tid för skörd av odlingen

För en grundlig utvärdering, vilket krävs för en slutsats om ett negativt resultat, bör samtliga tre försöksförhållanden som anges nedan tillämpas i en korttidsbehandling med och utan metabolisk aktivering samt en långtidsbehandling utan metabolisk aktivering (se punkterna 43, 44 och 45):

— Cellerna bör exponeras för testkemikalien utan metabolisk aktivering, under 3–6 timmar och prov bör tas ut vid en tid som motsvarar cirka 1,5 gånger den normala cellcykelns längd efter det att behandlingen har påbörjats (18).

— Cellerna bör exponeras för testkemikalien utan metabolisk aktivering, under 3–6 timmar och prov bör tas ut vid en tid som motsvarar cirka 1,5 gånger den normala cellcykelns längd efter det att behandlingen har påbörjats (18).

— Cellerna bör exponeras kontinuerligt utan metabolisk aktivering tills provtagning under en tidsperiod som motsvarar cirka 1,5 gånger de normala cellcykellängderna. Vissa kemikalier (t.ex. nukleosida analoger) kan vara enklare att detektera vid behandlings-/provtagningstider som är längre är 1,5 cykellängder (24).

Om något av de ovannämnda försöksförhållandena leder till en positiv respons kan andra behandlingssystem behöva övervägas.

Kromosompreparation

Cellkulturer behandlas vanligtvis med colcemid eller colchicin under 1–3 timmar före skörd. Varje cellkultur skördas och behandlas separat för preparationen av kromosomer. Kromosompreparation innefattar hypoton behandling av cellerna, fixering och infärgning. I monolager kan det finnas mitotiska celler (som identifieras genom att de är runda och lösgör sig från ytan) i slutet av behandlingen på 3–6 timmar. Eftersom dessa mitotiska celler enkelt lösgörs, kan de förloras när

▼M7

mediet som innehåller testkemikalien avlägsnas. Om det finns bevis för en betydande ökning av antalet mitotiska celler jämfört med kontrollerna, vilket tyder på en sannolik mitotisk hämning, bör cellerna samlas in genom centrifugering och tillsättas till odlingarna igen, så att man inte förlorar celler som är i mitos och som riskerar kromosomavvikelser vid skördetidpunkten.

Analys

Alla utstryksglas, inklusive de från positiva och negativa kontroller, bör få en oberoende kodning innan den mikroskopiska analysen av kromosomavvikelser utförs. Eftersom fixeringen ofta ger upphov till brott på en del metafaser, med åtföljande förlust av kromosomer, bör de celler som påträffas därför innehålla ett centromerantal på minst 2 n ± 2, där n är det haploida antalet kromosomer.

Åtminstone 300 väl spridda metafaser bör förekomma per koncentration och kontroll för att man ska kunna dra slutsatsen att testkemikalien är tydligt negativ (se punkt 45). De 300 cellerna bör fördelas lika mellan replikaten när replikatodlingar används. Om enstaka odlingar används per koncentration (se punkt 21) bör minst 300 väl spridda metafaser förekomma i den enstaka odlingen. Fördelen med att använda 300 celler som förekomst är att testets statistiska kraft ökar och nollvärden kommer sällan att observeras (nollvärdet förväntas endast uppgå till 5 %) (44). Antalet påträffade metafaser kan minskas om höga antal celler med kromosomavvikelser observeras och testkemikalien anses vara tydligt positiv.

Celler med strukturella kromosomavvikelser, inklusive och exklusive luckor, ska bedömas. Brott och luckor definieras i tillägg 1 enligt (45) (46). Avvikelser av kromatid- och kromosomtyp bör registreras separat och klassificeras enligt subtyper (brott, utbyten). Laboratoriets förfaranden ska säkerställa att analysen av kromosomavvikelser utförs av välutbildade bedömare och fackgranskas vid behov.

Även om syftet med testet är att detektera strukturella kromosomavvikelser, är det viktigt att notera frekvenserna för polyploidi och endoreduplikation när dessa händelser observeras. (Se punkt 2).

Laboratoriets kompetens

För att fastställa att det finns tillräcklig erfarenhet av testet innan det används för rutintestning bör laboratoriet utföra en rad försök med positiva referenskemikalier som agerar via olika mekanismer samt flera negativa kontroller (med användning av olika lösningsmedel/vehiklar). Dessa positiva och negativa kontrollresponser bör överensstämma med litteraturen. Detta gäller inte laboratorier som redan har erfarenhet, dvs. har en historisk databas enligt punkt 37.

Laboratoriet bör undersöka ett urval av positiva kontrollkemikalier (se tabell 1 i punkt 26) med korta och långa behandlingar utan metabolisk aktivering, och även med kort behandlingstid med metabolisk aktivering, för att visa att det har kompetens att upptäcka klastogena kemikalier och bestämma effektiviteten hos det metaboliska aktiveringssystemet. En rad koncentrationer av de valda kemikalierna bör användas för att ge reproducerbara och koncentrationsrelaterade ökningar över bakgrunden i syfte att visa testsystemets sensitivitet och dynamiska omfång.

▼M7

Historiska kontrolldata

Laboratoriet bör fastställa följande:

— Historiskt positivt kontrollintervall samt fördelning.

— Historiskt negativt (obehandlad, lösningsmedel) kontrollintervall samt fördelning.

Om data för en historisk negativ kontrollfördelning samlas in först bör de parallella negativa kontrollerna överensstämma med publicerade kontrolldata om sådana finns. Allteftersom kontrollfördelningen kompletteras med fler försöksdata bör de parallella negativa kontrollerna i idealfallet ligga inom fördelningens kontrollgräns på 95 % (44) (47). Laboratoriets historiska negativa kontrolldatabas kontroll bör inledningsvis baseras på minst 10 försök, men bör helst bestå av minst 20 försök utförda under jämförbara försöksbetingelser. Laboratorierna bör använda kvalitetskontrollmetoder såsom kontrolldiagram (t.ex. C-diagram eller X-stapeldiagram (48)), för att fastställa hur variabla deras positiva och negativa kontrolldata är och för att visa att metoden är ”under kontroll” (44). Fler rekommendationer om hur man bygger upp och använder historiska kontrolldatabaser (t.ex. kriterier för att innefatta och utesluta data samt acceptanskriterier för ett givet försök) finns i litteraturen (47).

Eventuella ändringar av försöksprotokollen bör övervägas när det gäller deras överensstämmelse med laboratoriets befintliga historiska kontrolldatabaser. Alla större inkonsekvenser bör leda till att en ny historisk kontrolldatabas upprättas.

Negativa kontrolldata bör bestå av förekomsten av celler med kromosomavvikelser från en enda odling eller summan av replikatodlingar enligt beskrivningen i punkt 21. Parallella negativa kontroller bör helst ligga inom kontrollgränsen på 95 % för fördelningen av laboratoriets historiska negativa kontrolldatabas (44) (47). Om parallella negativa kontrolldata faller utanför kontrollgränserna på 95 % kan de ändå ingå i den historiska kontrollfördelningen så länge de inte är extremt avvikande och det finns bevis för att testsystemet är under kontroll (se punkt 37) och att inga tekniska eller mänskliga fel begåtts.

DATA OCH RAPPORTERING

Presentation av resultaten

Procentandelen celler med strukturella kromosomavvikelser bör utvärderas. Avvikelser av kromatid- och kromosomtyp som klassificeras enligt subtyper (brott, utbyten) bör anges separat, med antal och intervaller för försöks- och kontrollodlingarna. Luckor i DNA-strängen registreras och rapporteras separat, men inkluderas i allmänhet inte i den totala avvikelsefrekvensen. Andelen polyploidi och/eller endoreduplicerade celler rapporteras om de observeras.

Parallella mätningar av cytotoxicitet för alla behandlade samt negativa och positiva kontrollkulturer i huvudförsöken avseende avvikelser bör samlas in.

Data bör anges per enskild odling. Dessutom bör alla data sammanfattas i tabellform.

Kriterier för godkännande

Testet måste uppfylla följande kriterier för att godkännas:

— Den parallella negativa kontrollen måste anses godtagbar för registrering i laboratoriets historiska databas över negativa kontroller enligt punkt 39.

▼M7

— Parallella positiva kontroller (se punkt 26) bör framkalla reaktioner som överensstämmer med de kontroller som genereras i en historiska databasen över positiva kontroller och ge en statistiskt signifikant ökning jämfört med den parallella negativa kontrollen.

— Cellproliferationskriterierna i lösningsmedelskontrollen bör vara uppfyllda (punkterna 17 och 18).

— Samtliga tre försöksbetingelser testades om inte ett gav positiva resultat (se punkt 28).

— Tillräckligt många celler och koncentrationer finns tillgängliga för analys (punkterna 31 och 21).

— Urvalskriterierna för toppkoncentrationen överensstämmer med de kriterier som beskrivs i punkterna 22, 23 och 24.

Utvärdering och tolkning av resultaten

Under förutsättning att samtliga acceptanskriterier är uppfyllda anses testkemikalien vara klart positiv om något av följande gäller för någon av de undersökta försöksbetingelserna (se punkt 28):

a) Åtminstone en av testkoncentrationerna uppvisar en statistiskt signifikant ökning jämfört med samtidig negativ kontroll.

b) Ökningen är dosrelaterad när den utvärderas med ett lämpligt trendtest.

c) Något av resultaten ligger utanför fördelningen av historiska negativa kontrolldata (t.ex. Poisson-baserade 95 %-kontrollgränser, se punkt 39).

Om alla dessa kriterier är uppfyllda anses testkemikalien kunna inducera kromosomavvikelser hos odlade däggdjursceller i detta testsystem. Rekommendationer om de lämpligaste statistiska metoderna finns i litteraturen (49) (50) (51).

Under förutsättning att samtliga acceptanskriterier är uppfyllda anses testkemikalien vara klart negativ om följande gäller för samtliga undersökta försöksbetingelser (se punkt 28):

a) Ingen av testkoncentrationerna uppvisar en statistiskt signifikant ökning jämfört med den parallella negativa kontrollen.

b) Det finns ingen koncentrationsrelaterad ökning vid utvärdering med ett lämpligt trendtest.

c) Alla resultat ligger inom fördelningen av historiska negativa kontrolldata (t.ex. Poisson-baserade 95 %-kontrollgränser, se punkt 39).

Testkemikalien anses inte kunna inducera kromosomavvikelser hos odlade däggdjursceller i detta testsystem.

Det finns inget krav på verifiering av ett tydligt positivt eller negativt svar.

Om responsen varken är klart negativ eller klart positiv enligt beskrivningen ovan eller för att göra det lättare att fastställa resultatets biologiska relevans bör uppgifterna fackgranskas och/eller undersökas ytterligare. Det kan även vara användbart att klassificera ytterligare celler (i förekommande fall) eller upprepa försöket, eventuellt med ändrade försöksbetingelser (t.ex. koncentrationsavstånd, andra metaboliska aktiveringsbetingelser (dvs. S9-koncentration eller S9-ursprung)).

I sällsynta fall är det inte möjligt att dra en slutsats om positiva eller negativa resultat trots ytterligare undersökningar, och i dessa fall anses den kemiska responsen vara tvetydig.

▼M7

En ökning av antalet polyploida celler kan utgöra en indikation på att testkemikalien har potential att inhibera mitotiska processer och att inducera numeriska kromosomavvikelser (52). En ökning av antalet celler med endoreduplicerade kromosomer kan utgöra en indikation på att testkemikalierna har potential att inhibera cellcykelns förlopp (53) (54) (se punkt 2). Därför bör förekomsten av polyploida celler och celler med endoreduplicerade kromosomer registreras separat.

Testrapport

Testrapporten ska innehålla följande information:

Testkemikalie:

— Källa, satsnummer, sista förbrukningsdag om detta anges.

— Testkemikaliens stabilitet i sig, om den är känd.

— Löslighet och stabilitet av testkemikalien i lösningsmedlet, om detta är känt.

— Mätning av pH, osmolalitet och utfällningar i det odlingsmedium till vilket testkemikalien tillsattes, i förekommande fall.

Monokomponentämne:

— fysiskt utseende, vattenlöslighet och ytterligare relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper,

— kemiska beteckningar, såsom IUPAC- eller CAS-beteckning, CAS–nummer, SMILES- eller InChI-kod, strukturell formel, renhet, kemisk beteckning på föroreningar i förekommande fall och om möjligt osv.

Multikomponentämne, UVCB och blandningar:

— Karakteriseras så långt som möjligt genom kemisk beteckning (se ovan), kvantitativ förekomst och relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper hos beståndsdelarna.

Lösningsmedel:

— Motivering av valet av lösningsmedel.

— Procentandelen lösningsmedel i den slutliga odlingsmediet ska också anges.

Celler:

— Typ av celler och deras källa.

— Den använda celltypens karyotypegenskaper och lämplighet.

— Avsaknad av mykoplasma för cellinjer.

— För cellinjer, uppgifter om cellcykelns längd, fördubblingstid eller proliferationsindex.

— Blodgivarnas kön, ålder och annan relevant information om givarna, helblod eller separerade lymfocyter, använd mitogen substans.

— Antal passager för cellinjer om sådan information finns.

— Metoder för underhållet av cellodlingar för cellinjer.

— Det modala antalet kromosomer för cellinjer.

▼M7

Testbetingelser:

— Identitet hos den kemikalie som stoppar celldelningen i metafasen, dess koncentration och cellexponeringens varaktighet.

— Testkemikaliens koncentration, uttryckt som slutlig koncentration i odlingsmediet (t.ex. µg eller mg/mL eller mM av odlingsmediet).

— Grund för val av koncentrationer och antalet kulturer inklusive t.ex. data för cytotoxicitet och löslighetsbegränsningar.

— Mediets sammansättning, CO_2-koncentration, om detta är tillämpligt, fuktighetsnivå.

— Koncentration (och/eller volym) av det lösningsmedel och den testkemikalie som tillsätts odlingsmediet.

— Inkubationstemperatur.

— Inkubationstid.

— Behandlingens varaktighet.

— Tidpunkten för skörd efter behandlingen.

— Celldensitet vid inokulering, om detta är tillämpligt.

— Typ och sammansättning hos det system som används för metabolisk aktivering (S9-källa, beredningsmetod för S9-blandningen, koncentration eller volym för S9-blandningen, S9 i det slutliga odlingsmediet, kvalitetskontroller av S9).

— Positiva och negativa kontrollkemikalier, slutkoncentrationer för varje behandlingsförhållande.

— Metoder för preparering av utstryksglas och färgningsteknik.

— Acceptanskriterier för försöken.

— Kriterier för hur avvikelser påvisas.

— Antal analyserade metafaser.

— Metoder för mätning av cytotoxicitet.

— All tilläggsinformation som är relevant rörande cytotoxicitet samt använd metod.

— Kriterier för att bedöma om testresultaten är positiva, negativa eller tvetydiga.

— Använda metoder för att bestämma pH, osmolalitet och utfällningar.

Resultat:

— Antal behandlade celler och antal skördade celler för varje odling om cellinjer används.

— Cytotoxiska mätningar, t.ex. RPD, RICC och MI samt eventuella andra iakttagelser.

— För cellinjer, uppgifter om cellcykelns längd, fördubblingstid eller proliferationsindex.

— Tecken på utfällning och tid för bestämningen.

▼M7

— Definition av avvikelser, inklusive luckor i DNA-strängen.

— Antal klassificerade celler, antal celler med kromosomavvikelser och typ av sådana avvikelser, angivna separat för varje behandlad kultur samt kontrollodling, inklusive och exklusive luckor.

— Förändringar i ploiditet (polyploida celler och celler med endoreduplicerade kromosomer registreras separat) om sådana påvisas.

— Koncentration-responsförhållande, där det är möjligt.

— Data om parallella negativa (lösningsmedel) och positiva kontroller (koncentrationer och lösningsmedel).

— Historiska negativa (lösningsmedel) och positiva kontrolldata med intervall, medelvärden, standardavvikelser och 95 %-kontrollgränser för distribution samt antalet uppgifter.

— statistiska analyser, p-värden om sådana finns.

Diskussion av resultaten.

Slutsatser.

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) 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, s. 1–29

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

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

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

(6) Kapitel B.49 i denna bilaga: *Mikronukleustest av däggdjursceller in vitro*.

(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. m.fl. (1991), Genotoxicity under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9, *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, vol.257/2, s. 147–204.

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

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

▼M7

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

(23) Natarajan, A.T. m.fl. (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, s. 83–90.

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

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

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

▼M7

(27) Matsushima, T. m.fl. (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. m.fl. (1994). Report from Working Group on *in vitro* Tests for Chromosomal Aberrations, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, vol. 312/3, s. 241–261.

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

(30) Unep (2001), Stockholmskonventionen om långlivade organiska föroreningar, United Nations Environment Programme (Uneo). Finns 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, s. 225–228.

(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, s. 91–103.

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

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

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

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

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

(38) Richardson, C. m.fl. (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.

(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 och 487) ENV/JM/TG(2014)17. Tillgänglig på begäran.

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

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

▼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. Finns 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. m.fl. (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. m.fl. (2011), Compilation and use of genetic toxicity historical control Data, *Mutation Research*, vol. 723/2, s. 87–90.

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

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

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

(51) Richardson, C. m.fl. (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, s. 29–46.

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

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

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

▼M7

Tillägg 1

DEFINITIONER

Aneuploidi: alla avvikelser från det normala antalet diploida (eller haploida) kromosomer med en eller flera kromosomer, men inte med hela uppsättningar kromosomer (polyploidi).

Apoptos: programmerad celldöd som karakteriseras av en serie steg som leder till sönderfall av celler till membranbundna partiklar som därefter elimineras genom fagocytos eller avstötning.

Cellproliferation: ökning av antalet celler som resultat av mitotisk celldelning.

Kemikalie: ett ämne eller en blandning.

Kromatidbrott: diskontinuitet i en enstaka kromatid där det finns en tydlig missanpassning hos en av kromatiderna.

Kromatidlucka: ej färgat område (akromatisk skada) hos en enstaka kromatid där det finns en minimal missanpassning hos kromatiden.

Avvikelse av kromatidtyp: strukturell kromosomskada uttryckt som brott på enstaka kromatider eller brott och återförening mellan kromatider.

Avvikelse av kromosomtyp: strukturell kromosomskada uttryckt som brott och återförening, på båda kromatiderna på samma ställe.

Klastogen: alla kemikalier som orsakar strukturella kromosomavvikelser i populationer av celler eller organismer.

Koncentrationer: slutliga koncentrationer av testkemikalien i odlingsmediet.

Cytotoxicitet: För försök med användning av cellinjer som omfattas av denna testmetod avser cytotoxicitet en minskning av den relativa populationsfördubblingen (RPD) eller en relativ ökning av celltal (RICC) i behandlade celler jämfört med den negativa kontrollen (se punkt 17 och tillägg 2). För försök med användning av primära odlingar av lymfocyter som omfattas av denna testmetod avser cytotoxicitet en minskning av det mitotiska indexet (MI) hos behandlade celler jämfört med den negativa kontrollen (se punkt 18 och tillägg 2).

Endoreduplikation: en process där kärnan efter en S-fas under DNA-replikationen inte övergår i mitos utan inleder ännu en S-fas. Resultatet är kromosomer med 4, 8, 16, ... kromatider.

Genotoxisk: allmän term som omfattar alla typer av DNA- eller kromosomskador, inklusive brott, deletioner, addukter, modifieringar av och kopplingar mellan nukleotider, omlagringar, genmutationer, kromosomavvikelser och aneuploidi. Inte alla typer av genotoxiska effekter leder till mutationer eller stabila kromosomskador.

Mitotiskt index (MI): den andel celler som är i metafas delat med det totala antalet celler som kan observeras i en cellpopulation; en indikation på graden av tillväxt hos den populationen.

Mitos: delning av cellkärnan, i regel bestående av profas, prometafas, metafas, anafas och telofas.

Mutagent ämne: ämne som producerar en ärftlig ändring av DNA-baspars-sekvensen (-sekvenserna) i gener eller i kromosomstrukturen (kromosomavvikelser).

▼M7

Numerisk avvikelse: en förändring av antalet kromosomer jämfört med det normala antalet karakteristika hos de celler som används.

Polyploidi: numeriska kromosomavvikelser i celler eller organismer som inbegriper en eller flera hela kromosomuppsättningar, i motsats till en enskild kromosom eller kromosomer (aneuploidi).

p53-status: p53-proteinet är involverat i cellcykelreglering, apoptos och DNA-reparation. Celler som lider brist på funktionellt p53-protein och är oförmögna att stoppa cellcykeln eller eliminera skadade celler via apoptos eller andra mekanismer (t.ex. induktion av DNA-reparation) i samband med p53-funktioner till svar på en DNA-skada, bör teoretiskt sett vara mer benägna till genmutationer eller kromosomavvikelser.

Relativ ökning i celltal (RICC): ökning av antalet celler i kemiskt exponerade kulturer jämfört med ökningar i icke-behandlade kulturer, ett förhållande uttryckt i procent.

Relativ populationsfördubbling (RPD): ökning av antalet populationsfördubblingar i kemiskt exponerade kulturer jämfört med ökningen i icke-behandlade kulturer, ett förhållande uttryckt i procent.

S9-leverfraktion: supernatant av leverhomogenat efter centrifugering vid 9 000 g, dvs. råleverextrakt.

S9-blandning: blandning av S9-leverfraktion och kofaktorer som krävs för metaboliska enzymers aktivitet.

Lösningsmedelskontroll: Allmän term för att definiera kontrollodlingar där endast lösningsmedel används för att lösa upp testkemikalien.

Strukturell avvikelse: en förändring i kromosomstrukturen som kan detekteras genom en mikroskopisk undersökning av celldelningens metafasstadium, och som uppträder i form av deletioner och fragment, interna eller externa utbyten.

Testkemikalie: alla ämnen eller blandningar som testas med denna testmetod.

Obehandlade kontroller: odlingar som inte behandlas (dvs. varken testkemikalie eller lösningsmedel tillsätts), men som behandlas parallellt på samma sätt som de odlingar där testkemikalien tillsätts.

▼M7

Tillägg 2

FORMLER FÖR BESTÄMNING AV CYTOTOXICITET

Mitotiskt index (MI):

$$\mathbf{MI}(\%) = \frac{\text{antal mitotiska celler}}{\text{totalt antal räknade celler}} \times 100$$

Relativ ökning av celltal (RICC) eller relativ populationsfördubbling (RPD) rekommenderas, eftersom den andel av cellpopulationen som har delat sig beaktas i båda metoderna.

$$\mathbf{RICC}(\%) = \frac{(\text{ökning av antalet celler i behandlade kulturer(slutligt–initialt)})}{(\text{ökning av antalet celler i kontrollkulturer(slutligt–initialt)})} \times 100$$

$$\mathbf{RPD}(\%) = \frac{(\text{antal populationsfördubblingar i behandlade kulturer})}{(\text{antal populationsfördubblingar i behandlade kulturer})} \times 100$$

där

Populationsfördubbling: [log (Cellantal efter behandling ÷ Ursprungligt cellantal)] ÷ log 2

En RICC eller en RPD på 53 % indikerar t.ex. 47 % cytotoxicitet/cytostas, och 55 % cytotoxicitet/cytostas mätt med MI innebär att det faktiska MI är 45 % av kontrollen.

I alla händelser bör antalet celler före behandling mätas, vilket även gäller behandlade och negativa kontrollodlingar.

Tidigare användes RCC (dvs. antalet celler i behandlade kulturer/antalet celler i kontrollkulturer) som cytotoxicitetsparameter, men rekommenderas inte längre eftersom cytotoxiciteten kan underskattas enligt detta mått.

I negativa kontrollkulturer bör populationsfördubblingstiden överensstämma med kravet på provtagning av celler efter behandling vid en tidpunkt som motsvarar cirka 1,5 gånger den normala cellcykelns längd. Det mitotiska indexet bör vara tillräckligt högt för att få ett tillräckligt antal celler i mitos och tillförlitligt beräkna en minskning med 50 %.

▼M7

B.11 TEST AV KROMOSOMAVVIKELSER I BENMÄRG HOS DÄGGDJUR

INLEDNING

Den här testmetoden motsvarar OECD:s testriktlinje 475 (2016). Det är en del av en serie av testmetoder för genetisk toxikologi. Ett OECD-dokument som ger kortfattad information om tester inom genetisk toxikologi och en översikt över de senaste ändringarna av dessa testriktlinjer har utarbetats (1).

Tester av kromosomavvikelser i benmärg hos däggdjur är särskilt relevanta för att bedöma gentoxicitet, eftersom faktorer rörande in vivo-metabolism, farmakokinetik och DNA-reparationsprocesser är aktiva och bidrar till responsen, även om de varierar mellan arterna. Ett test in vivo är även användbart för fortsatta undersökningar av gentoxicitet, med detektion i ett in vitro-system.

Testet in vivo av kromosomavvikelser hos däggdjur används för att detektera strukturella kromosomavvikelser inducerade av testkemikalier i benmärgsceller hos djur, vanligen hos gnagare (2) (3) (4) (5). Strukturella kromosomavvikelser kan vara av två typer, kromosomala eller kromatida. Huvuddelen av de gentoxiska kemikalieinducerade avvikelserna är av kromatidtyp, men även avvikelser av kromosomtyp förekommer. Kromosomskada och liknande händelser är orsaken till många genetiska sjukdomar hos människa och det finns omfattande bevis för att sådana skador och liknande händelser, när de ger upphov till förändringar i onkogener och tumörsuppressorgener, är inblandade i cancer hos människa och i experimentella system. Polyploidi (inklusive endoreduplicering) kan uppstå vid tester av kromosomavvikelser in vivo. En ökning av polyploidi tyder inte i sig på aneugener, och kan helt enkelt tyda på störningar i cellcykeln eller cytotoxicitet. Detta test är inte utformat för att mäta aneuploidi. Mikrokärntest in vivo av erytrocyter hos däggdjur (kapitel B.12 i denna bilaga) och däggdjurmikrokärntest in vivo av erytrocyter (kapitel B.49) i denna bilaga är det in vivo- respektive in vitro-test som rekommenderas för detektion av aneuploidi.

Definitioner av använd terminologi anges i tillägg 1.

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN

Gnagare används rutinmässigt i detta test, men även andra arter kan vara lämpliga i vissa fall om det är vetenskapligt motiverat. Benmärg är målvävnaden i detta test, eftersom det är en mycket kärlrik vävnad som innehåller en cellpopulation med en snabb cellcykel, och där cellerna enkelt kan isoleras och bearbetas. Om andra arter än råttor och möss används bör en vetenskaplig motivering lämnas i rapporten. Om andra arter än gnagare används bör mätningen av kromosomavvikelser i benmärg integreras i ett annat lämpligt toxicitetstest.

Om det finns bevis för att testkemikalien eller dess metaboliter inte kommer att nå målvävnaden kan detta test vara olämpligt att använda.

Innan testmetoden används på en blandning i syfte att samla in data för ett lagstadgat ändamål bör man överväga om, och i så fall varför, den kommer att ge godtagbara resultat för det syftet. Sådana överväganden är inte nödvändiga om blandningen måste provas enligt lag.

▼M7

TESTMETODENS PRINCIP

Försöksdjuren exponeras för testkemikalien genom en lämplig exponeringsväg och avlivas sedan humant vid en lämplig tid efter behandlingen. Innan de avlivas behandlas djuren med ett ämne som gör att celler stannar upp i metafas (t.ex. colchicin eller colcemid). Kromosomberedningar görs sedan från benmärgscellerna och färgas in, varpå celler i metafas analyseras med avseende på kromosomavvikelser.

KONTROLL AV LABORATORIEKOMPETENS

Kompetensundersökningar

För att fastställa att det finns tillräcklig erfarenhet av testet innan det används för rutintestning bör laboratoriet visa sin förmåga att reproducera förväntade resultat från publicerade data (för kromosomavvikelser (6) t.ex. frekvenser med minst två positiva kontrollkemikalier (inklusive svag respons inducerad av låga doser av positiva kontroller) enligt tabell 1 och med förenliga vehikel-/lösningsmedelskontroller (se punkt 22). I försöken bör man använda doser som ger reproducerbara och dosrelaterade ökningar och visar testsystemets sensitivitet och dynamiska omfång när det gäller den berörda vävnaden (benmärg), med användning av den klassificeringsmetod som laboratoriet tillämpar. Detta gäller inte laboratorier som redan har erfarenhet, dvs. har en historisk databas enligt punkterna 10–

Historiska kontrolldata

Laboratoriet bör fastställa följande i kompetenundersökningarna:

— Ett historiskt positivt kontrollintervall och fördelning.

— Ett historiskt negativt kontrollintervall och fördelning.

Om data för en historisk negativ kontrollfördelning samlas in först bör de parallella negativa kontrollerna överensstämma med publicerade kontrolldata om sådana finns. Allteftersom den historiska kontrollfördelningen kompletteras med fler försöksdata bör de parallella negativa kontrollerna i idealfallet ligga inom fördelningens kontrollgräns på 95 %. Laboratoriets historiska negativa kontrolldatabas bör vara statistiskt robust för att säkerställa laboratoriets förmåga att bedöma fördelningen av negativa kontrolldata. Enligt litteraturen kan minst 10 försök behövas, men databasen bör helst bestå av minst 20 försök utförda under jämförbara försöksbetingelser. Laboratorierna bör använda kvalitetskontrollmetoder såsom kontrolldiagram (t.ex. C-diagram eller X-stapeldiagram (7)), för att fastställa hur variabla deras data är och för att visa att metoden är ”under kontroll”. Fler rekommendationer om hur man bygger upp och använder historiska kontrolldatabaser (t.ex. kriterier för att innefatta och utesluta data samt acceptanskriterier för ett givet försök) finns i litteraturen (8).

Om laboratoriet inte slutför ett tillräckligt antal försök för att fastställa en statistiskt robust negativ kontrollfördelning (se punkt 11) under kompetensundersökningarna (beskrivs i punkt 9) kan fördelningen byggas upp under de första rutintesterna. Denna strategi bör följa rekommendationerna i litteraturen (8) och de negativa kontrollresultat som erhållits i dessa experiment bör överensstämma med publicerade negativa kontrolldata.

▼M7

Eventuella ändringar av försöksprotokollen bör övervägas för att se till att resulterande data fortfarande överensstämmer med laboratoriets befintliga historiska kontrolldatabas. Endast stora inkonsekvenser bör leda till upprättandet av en ny historisk kontrolldatabas om en fackgranskning fastslår att den skiljer sig från den föregående fördelningen (se punkt 11). Om en ny databas byggs upp kanske inte en fullständig negativ kontrolldatabas behövs för att utföra ett faktiskt test, under förutsättning att laboratoriet kan visa att dess parallella negativa kontrollvärden fortfarande överensstämmer med den tidigare databasen eller motsvarande publicerade data.

Negativa kontrolldata bör bestå av förekomsten av strukturella kromosomavvikelser (exklusive luckor) hos varje djur. Parallella negativa kontroller bör helst ligga inom kontrollgränsen på 95 % för fördelningen av laboratoriets historiska negativa kontrolldatabas. Om parallella negativa kontrolldata faller utanför kontrollgränserna på 95 % kan de ändå ingå i den historiska kontrollfördelningen så länge de inte är extremt avvikande och det finns bevis för att testsystemet är under kontroll (se punkt 11) och att inga tekniska eller mänskliga fel begåtts.

BESKRIVNING AV TESTMETODEN

Förberedelser

Val av djurart

Unga och friska vuxna exemplar som härrör från normala laboratoriestammar. Oftast används råttor, men även möss kan vara lämpliga. Andra lämpliga däggdjursarter kan användas om en vetenskaplig motivering anges i rapporten.

Inhysnings- och utfodringsförhållanden

För gnagare bör temperaturen i djurens rum bör vara 22 °C (± 3 °C). Den relativa fuktigheten bör helst vara 50–60 %, men minst 40 % och bör helst inte överstiga 70 % utom när rummet rengörs. Artificiell belysning bör användas, med en dygnsrytm på 12 timmar ljus och 12 timmar mörker. För utfodring kan konventionellt laboratoriefoder användas med obegränsad tillgång till dricksvatten. Valet av foder kan påverkas av behovet av att säkerställa en lämplig blandning av en testkemikalie när den administreras genom denna väg. Gnagare bör hållas i små grupper (högst fem per bur) av samma kön och behandlingsgrupp, om inget aggressivt beteende kan förväntas, företrädesvis i fasta golvburar med lämplig miljöberikning. Djuren får endast hållas individuellt om det är vetenskapligt motiverat.

Förberedelse av djuren

Normalt används friska unga vuxna djur (6–10 veckor gamla vid behandlingsstarten, även om något äldre djur också är godtagbara) som slumpvis väljs ut till kontroll- och behandlingsgrupperna. Djuren ska ha en unik identifiering som appliceras med en human och minimalt invasiv metod (t.ex. ringmärkning, taggar, mikrochip eller biometrisk identifiering, men inte öron- eller tassclips). De bör vänjas vid förhållandena i laboratoriet under minst fem dagar. Burarna bör placeras så att eventuella verkningar på grund av placeringen minimeras. Korskontaminering av den positiva kontrollen och testkemikalien bör undvikas. Vid undersökningens början bör viktskillnaderna mellan försöksdjuren vara minimal och inte överskrida ± 20 % av medelvikten för varje kön.

Beredning av doser

Fasta testkemikalier bör lösas upp i, eller blandas med, lämpliga lösningsmedel eller vehiklar eller blandas i foder eller dricksvatten innan dosen administreras till djuren. Testkemikalier i flytande form kan doseras direkt eller spädas ut före doseringen. Vid inhalationexponering kan testkemikalier administreras såsom gas,

▼M7

ånga eller en fast/flytande aerosol, beroende på deras fysikalisk-kemiska egenskaper. Nygjorda beredningar av testkemikalien bör användas om inte stabilitetsdata visar att lagringen är acceptabel och lämpliga lagringsförhållanden bör fastställas.

Lösningsmedel/vehikel

Lösningsmedlet/vehikeln bör inte ge upphov till toxiska effekter vid de dosnivåer som används och bör inte kunna misstänkas för att reagera kemiskt med testkemikalien. Om andra lösningsmedel/vehiklar än väl kända används bör det finnas referensdata som visar att de är kompatibla. När det är möjligt, rekommenderas att man i första hand överväger vattenbaserade lösningsmedel/vehiklar. Exempel på vanliga kompatibla lösningsmedel/vehiklar är vatten, fysiologisk saltlösning, metylcellulosalösning, karboximetylcellulosa natriumsaltlösning, olivolja och majsolja. I avsaknad av historiska eller publicerade kontrolldata som visar att inga strukturella avvikelser eller andra skadliga effekter induceras av det valda lösningsmedlet/vehikeln bör en preliminär undersökning utföras för att fastställa acceptansen för vehikelkontrollen.

Kontroller

Positiva kontroller

En grupp djur som behandlas med en positiv kontrollkemikalie bör normalt ingå i varje test. Denna regel kan frångås om testlaboratoriet har visat att det är kvalificerat att utföra testet och har fastställt ett historiskt positivt kontrollintervall. Om en parallell positiv kontrollgrupp inte ingår bör klassificeringskontroller (fasta och ofläckade utstryksglas) inkluderas i varje försök. Detta kan åstadkommas genom att inbegripa lämpliga referensprover i klassificeringen av undersökningen som har erhållits och lagrats från ett separat positivt kontrollförsök som utförs med jämna mellanrum (.tex var 6:e till 18 månad) på det laboratorium där testet utförs, t.ex. under kvalifikationsprövning och vid behov med jämna mellanrum därefter.

Positiva kontrollkemikalier bör på ett tillförlitligt sätt ge en detekterbar ökning i frekvensen av celler med strukturella kromosomavvikelser över den spontana nivån. Positiva kontrolldoser bör väljas på ett sådant sätt att effekterna är tydliga men inte omedelbart avslöjar identiteten hos de kodade proverna för bedömaren. Det är acceptabelt att den positiva kontrollen administreras via en annan tillförselväg än testkemikalien och enligt ett annat behandlingsschema, och att provtagningen endast sker vid ett tillfälle. Dessutom kan användningen av kemiska klassrelaterade positiva kontrollkemikalier övervägas i förekommande fall. Exempel på positiva kontrollkemikalier ges i tabell 1.

Tabell 1

Exempel på positiva kontrollkemikalier

Kemikalie	CASRN
Etylmetansulfonat	62-50-0
Metylmetansulfonat	66-27-3
Etylnitrosourea	759-73-9
Mitomycin C	50-07-7
Cyklofosfamid (monohydrat)	50-18-0 (6055-19-2)
Trietylenmelamin	51-18-3

▼M7

Negativa kontroller

Djur från den negativa kontrollgruppen bör inkluderas vid varje provtagningstillfälle och i övrigt hanteras på samma sätt som behandlingsgrupperna, med undantag för att de inte behandlas med testkemikalien. Om lösningsmedel/vehikel används för att tillföra testkemikalien bör kontrollgruppen tillföras lösningsmedlet/vehikeln. Om testlaboratoriet påvisar enhetliga variationer mellan djur och frekvenser av celler med strukturella avvikelser genom historiska negativa kontrolldata vid varje provtagningstillfälle kan det dock vara tillräckligt med en enda provtagning för den negativa kontrollen. Om en enda provtagning används för negativa kontroller bör den vara det första provtagningstillfället i undersökningen.

FÖRFARANDET

Djurens antal och kön

I regel är responsen när det gäller mikrokärnor liknande mellan han- och hondjur (9), och detta förväntas även gälla strukturella kromosomavvikelser. De flesta försök kan därför utföras på båda könen. Om det finns data som visar på relevanta skillnader mellan hanar och honor (t.ex. skillnader i systemisk toxicitet, metabolism, biotillgänglighet, benmärgstoxicitet osv., inklusive ett preliminärt test) bör båda könen användas. I detta fall kan det vara lämpligt att göra en undersökning av båda könen, t.ex. som en del av en upprepad dostoxicitetsundersökning. Om båda könen används kan ett faktorförsök vara lämpligt. En närmare beskrivning av hur man analyserar data med användning av faktorförsök ges i tillägg 2.

Gruppernas storlek vid försöksstarten bör fastställas. Målet bör vara minst fem analyserbara djur av ett kön, eller av varje kön om båda könen används, per grupp. I de fall där exponering av människa för kemikalier kan ge könsspecifika resultat, som t.ex. för vissa läkemedel, bör testet utföras med försöksdjur av lämpligt kön. Som en vägledning för ett vanligt krav på maximalt antal djur skulle det krävas 45 djur för en benmärgsundersökning med två provtagningstillfällen, tre dosgrupper och en parallell negativ kontrollgrupp plus en positiv kontrollgrupp (fem djur av ett kön i varje grupp).

Dosnivåer

Om det inte redan finns lämpliga data som kan ge vägledning om dosval och en preliminär undersökning därför utförs för att fastställa omfattningen, bör denna undersökning utföras i samma laboratorium, och med samma arter, stammar, kön och behandlingsschema som senare ska användas i huvudundersökningen (10). Syftet med undersökningen bör vara att identifiera högsta tolererbara dos (MTD), som definieras som den dos som tolereras utan bevis för toxicitet som begränsar undersökningen i förhållande till dess varaktighet (t.ex. genom att inducera minskad kroppsvikt eller hematopoietisk systemcytotoxicitet, men inte dödlighet eller tecken på smärta, lidande eller ångest som kräver human avlivning (11)).

Den högsta dosen kan även definieras som en dos vilken producerar en indikation på toxicitet för benmärgen.

Kemikalier som uppvisar mättnad av toxikokinetiska egenskaper eller inducerar avgiftningsprocesser som kan leda till minskad exponering efter långtidsbehandling kan vara undantag från kriterierna för dosbestämning och bör utvärderas från fall till fall.

För att inhämta data om dosrespons bör en fullständig undersökning omfatta en negativ kontrollgrupp och minst tre dosnivåer som vanligen separeras av en faktor på 2, men inte högre än 4. Om testkemikalien inte visar toxicitet i en preliminär undersökning eller baserat på befintliga uppgifter bör den högsta dosen för engångsdosering vara 2 000 mg/kg kroppsvikt. Om testkemikalien

▼M7

orsakar toxicitet bör MTD vara den högsta dosen och de dosnivåer som används bör helst omfatta ett intervall från maxdos till en dos som producerar liten eller ingen toxicitet. När toxicitet i målvävnaden (benmärg) observeras vid alla testade dosnivåer rekommenderas fortsatta undersökningar med icke-toxiska doser. Undersökningar som syftar till att mer grundligt karakterisera kvantitativ information om dosrespons kan kräva ytterligare dosgrupper. Dessa gränser kan variera för vissa typer av testkemikalier (t.ex. humanläkemedel) som omfattas av särskilda krav.

Toleranstest

Om försök för att fastställa dosering eller befintliga data från besläktade djurstammar tyder på att ett behandlingssystem med minst gränsdosen (beskrivs nedan) inte ger några observerbara toxiska effekter (ingen minskning av benmärgens proliferation eller andra bevis på cytotoxicitet i målvävnaden), och om ingen gentoxicitet förväntas baserat på in vitro-undersökningar av gentoxicitet eller data från strukturellt besläktade kemikalier, anses det kanske inte nödvändigt med ett fullständigt test med tre dosnivåer, under förutsättning att det har påvisats att testkemikalien når målvävnaden (benmärg). I sådana fall kan en enda dosnivå, vid gränsdosen, vara tillräcklig. För en administrationsperiod på > 14 dagar är gränsdosen 1 000 mg/kg kroppsvikt/dag. För administrationsperioder på 14 dagar eller mindre är gränsdosen 2 000 mg/kg/kroppsvikt/dag.

Tillförsel av doser

Den förväntade exponeringsvägen för människor bör beaktas vid utformningen av en analys. Därför kan exponeringsvägar (t.ex. föda, dricksvatten, lokalt, subkutant, intravenöst, oralt (via sond), inhalation, intratrakealt eller implantation) väljas som motiverad exponering. Exponeringsvägen bör i alla händelser väljas för att säkerställa lämplig exponering av målvävnaden. Intraperitoneal injektion rekommenderas generellt inte eftersom den inte är en avsedd exponeringsväg för människor, och bör endast användas med specifik vetenskaplig motivering. Om testkemikalien blandas i födan eller dricksvattnet bör man, särskilt i fråga om engångsdosering, se till att fördröjningen mellan födo- och vattenintag och provtagning är tillräcklig för att upptäcka effekterna (se punkterna 33–34). Den maximala vätskevolymen som kan administreras genom sondmatning eller injektion vid ett tillfälle beror på försöksdjurets storlek. Volymen bör normalt inte överstiga 1 ml per 100 g kroppsvikt, utom för vattenlösningar där högst 2 ml/100 g får användas. Användning av volymer som är större än så bör motiveras. Med undantag för irriterande eller frätande testkemikalier, som normalt kommer att ge stegrade verkningar vid högre koncentrationer, bör variationer av testvolymen minimeras genom justering av koncentrationen för att säkerställa att en konstant volym ges i förhållande till kroppsvikten vid alla dosnivåer.

Behandlingsschema

Testkemikalierna ges normalt som en enstaka behandling, men kan även ges som en delad dos (dvs två eller flera behandlingar samma dag med högst 2–3 timmars mellanrum) för att underlätta tillförsel av stora volymer. Under dessa omständigheter eller när tillförseln av testkemikalien sker via inhalation bör provtagningstiden planeras baserat på tidpunkten för den sista doseringen eller när exponeringen upphör.

Det finns få uppgifter om huruvida ett protokoll med upprepade doser är lämpligt för detta test. Under omständigheter där det är önskvärt att integrera detta test med ett toxicitetstest med upprepade doser bör man dock vara noga med att undvika förlust av mitotiska celler med kromosomskador, som kan förekomma vid toxiska doser. Integrering är godtagbar när den högsta dosen är större eller

▼M7

motsvarar gränsdosen (se punkt 29) och en dosgrupp ges som gränsdos under behandlingsperiodens varaktighet. Mikrokärntest (testmetod B.12) bör vara det in vivo-test som väljs för kromosomavvikelser när integrering med andra undersökningar är önskvärt.

Benmärgsprov bör tas vid två separata tillfällen efter enstaka behandlingar. För gnagare bör det första provtagningsintervallet vara den tid som krävs för att slutföra 1,5 normala cellcykellängder (normalt 12–18 timmar efter behandlingsperioden). Eftersom den tid som krävs för upptag och metabolism av testkemikalien och dess effekt på cellcykelns kinetik kan påverka den optimala tiden för detektion av kromosomavvikelser, rekommenderas att provtagningen senareläggs till 24 timmar efter det första provtagningstillfället. Vid det första provtagningstillfället bör alla dosgrupper behandlas och prover samlas in för analys. Vid senare provtagningstillfällen behöver endast den högsta dosen ges. Om doseringar på mer än en dag används baserat på en vetenskaplig motivering bör man ha ett provtagningstillfälle vid upp till cirka 1,5 gånger den normala cellcykelns längd efter den slutliga behandlingen.

Efter behandling och före provtagning injiceras försöksdjuren intraperitonealt med en lämplig dos av ett metafashämmande medel (t.ex. colcemid eller colchicin), och prover samlas in vid ett lämpligt intervall därefter. För möss är detta intervall ungefär 3–5 timmar före insamlingen och för råttor 2–5 timmar. Celler skördas från benmärgen, svullna, fixerade och färgade, och analyseras med avseende på kromosomavvikelser (12).

Observationer

Allmänna kliniska observationer av testdjuren bör göras och kliniska tecken registreras minst en gång per dag, helst vid samma tidpunkt med hänsyn till maximalt förväntade effekter efter doseringen. Djuren bör observeras minst två gånger dagligen under doseringsperioden beträffande morbiditet och mortalitet. Alla djur bör vägas när undersökningen inleds, åtminstone en gång i veckan under undersökningar med upprepad dosering och vid avlivning. För undersökningar som varar minst en vecka bör mätning av foderkonsumtion göras minst en gång i veckan. Om testkemikalien tillförs via dricksvattnet bör även vattenkonsumtionen mätas vid varje byte av vatten och minst en gång i veckan. Djur som uppvisar icke-dödliga indikatorer på överskottstoxicitet bör avlivas på ett humant sätt innan testperiodens slut (11).

Exponering av målvävnaden

Blodprov tas vid lämpliga tidpunkter för att möjliggöra undersökningar av testkemikaliens plasmanivåer. Syftet med detta är att visa att benmärgen har exponerats om så krävs och om det inte finns andra exponeringsdata (se punkt 44).

Benmärg och kromosompreparat

Omedelbart efter det att djuren avlivats humant tas benmärgsceller från djurens lår- eller skenben, exponeras för hypoton lösning och fixeras. Metafascellerna sprids sedan ut på utstryksglas och färgas med användning av etablerade metoder (se (3) (12)).

▼M7

Analys

Alla utstryksglas, inklusive utstryksglas med positiva och negativa kontroller, bör ges en oberoende kodning före analysen och bör randomiseras så att bedömaren inte känner till behandlingsbetingelserna.

Det mitotiska indexet bör fastställas som ett mått på cytotoxicitet hos minst 1 000 celler per djur för alla behandlade försöksdjur (inklusive positiva kontroller), obehandlade försöksdjur eller djur för negativ kontroll med vehikel/lösningsmedel.

Minst 200 metafaser bör analyseras för varje djur med avseende på strukturella kromosomavvikelser, inklusive och exklusive luckor (6). Om den historiska databasen över negativa kontroller visar att bakgrundsmedelvärdet för frekvensen för strukturella kromosomavvikelser är < 1 % på testlaboratoriet bör man överväga att klassificera ytterligare celler. Avvikelser av kromatid- och kromosomtyp bör registreras separat och klassificeras enligt subtyper (brott, utbyten). Laboratoriets förfaranden ska säkerställa att analysen av kromosomavvikelser utförs av välutbildade bedömare och fackgranskas vid behov. Eftersom beredningen av utstryksglas ofta resulterar i brott på en del av de celler som är i metafas med förlust av kromosomer som följd, bör de celler som påträffas därför innehålla ett centromererantal på minst 2n ± 2, där *n* är antalet haploider för kromosomerna hos den arten.

DATA OCH RAPPORTERING

Behandling av resultaten

Individuella djurdata bör presenteras i tabellform. Mitotiskt index, antalet metafasceller som påträffas, antalet avvikelser per metafascell och procentandelen celler med strukturella kromosomavvikelser utvärderas för varje djur. Olika typer av strukturella kromosomavvikelser bör listas med antal och frekvenser för behandlade grupper och kontrollgrupper. Luckor samt polyploida celler och celler med endoreduplicerade kromosomer registreras separat. Frekvensen av luckor rapporteras men tas i regel inte med i analysen av den totala strukturella avvikelsefrekvensen. Om det inte finns några bevis för en skillnad i resultaten mellan könen, kan data kombineras för statistisk analys. Uppgifter om toxicitet för djur och kliniska tecken bör också rapporteras.

Kriterier för godkännande

Följande kriterier avgör om testet är godtagbart:

a) Parallella negativa kontrolldata anses godtagbara för registrering i laboratoriets historiska databas (se punkterna 11–14).

b) Parallella positiva kontroller eller klassificeringskontroller bör framkalla reaktioner som överensstämmer med de kontroller som genereras i den historiska databasen över positiva kontroller och ge en statistiskt signifikant ökning jämfört med den negativa kontrollen (se punkterna 20–21).

c) Ett lämpligt antal doser och celler har analyserats.

d) Urvalskriterierna för högsta dos överensstämmer med de kriterier som beskrivs i punkterna 25–28.

Utvärdering och tolkning av resultaten

Under förutsättning att samtliga acceptanskriterier är uppfyllda anses testkemikalien vara klart positiv om följande gäller:

▼M7

a) Åtminstone en av behandlingsgrupperna uppvisar en statistiskt signifikant ökning av frekvensen av celler med strukturella kromosomavvikelser (exklusive luckor) jämfört med den parallella negativa kontrollen.

b) Ökningen är dosrelaterad vid minst ett provtagningstillfälle när den utvärderas med ett lämpligt trendtest.

c) Något av resultaten ligger utanför fördelningen av historiska negativa kontrolldata (t.ex. Poisson-baserade 95 %-kontrollgränser.

Om endast den högsta dosen undersöks vid ett visst provtagningstillfälle anses en testkemikalie vara klart positiv om det finns en statistiskt säkerställd ökning jämfört med den parallella negativa kontrollen och resultaten ligger utanför fördelningen av historiska negativa kontrolldata (t.ex. Poisson-baserade 95 %-kontrollgränser). Rekommendationer om lämpliga statistiska metoder finns i litteraturen (13). Om en dos-responsanalys genomförs bör minst tre behandlade dosgrupper analyseras. Statistiska tester som används bör betrakta djuret som den experimentella enheten. Positiva resultat i testet av kromosomavvikelser visar att testkemikalien inducerar strukturella kromosomavvikelser i benmärgen hos de arter som testades.

Under förutsättning att samtliga acceptanskriterier är uppfyllda anses testkemikalien vara klart negativ om följande gäller för samtliga undersökta försöksbetingelser:

a) Ingen av behandlingsgrupperna uppvisar en statistiskt signifikant ökning av frekvensen av celler med strukturella kromosomavvikelser (exklusive luckor) jämfört med den parallella negativa kontrollen.

b) Ingen dosrelaterad ökning förekommer vid något provtagningstillfälle vid utvärdering med ett lämpligt trendtest.

c) Alla resultat ligger inom fördelningen av historiska negativa kontrolldata (t.ex. Poisson-baserade 95 %-kontrollgränser.

d) Benmärgen exponerades för testkemikalien.

Rekommendationer om de lämpligaste statistiska metoderna finns i litteraturen (13). Bevis för att benmärgen exponerats för en testkemikalie kan vara en minskning av det mitotiska indexet eller mätningar av plasma- och blodnivåerna i förhållande till testkemikalien. Vid intravenös tillförsel behövs inga bevis på exponering. Alternativt kan ADME-data, som erhållits i en oberoende undersökning med samma exponeringsväg och samma arter, användas för att visa benmärgsexponering. Negativa resultat indikerar att testkemikalien, under dessa försöksbetingelser, inte inducerar strukturella kromosomavvikelser i benmärgen hos de arter som testades.

Det finns inget krav på verifiering av ett tydligt positivt eller negativt svar.

Om responsen varken är klart negativ eller klart positiv och för att göra det lättare att fastställa resultatets biologiska relevans (t.ex. en svag ökning eller en ökning som ligger på gränsen) bör de försök som slutförts fackgranskas och/eller undersökas ytterligare. I vissa fall kan analys av fler celler eller ett upprepat försök med modifierade försöksbetingelser vara användbart.

▼M7

I sällsynta fall är det inte möjligt att dra en slutsats om huruvida testkemikalien ger positiva eller negativa resultat trots ytterligare undersökningar, och i dessa fall anses undersökningen vara tvetydig.

Frekvenserna av polyploida och endoreduplicerade metafaser bland det totala antalet metafaser bör registreras separat. En ökning av antalet polyploida/endoreduplicerade celler kan utgöra en indikation på att testkemikalierna har potential att inhibera mitotiska processer eller cellcykelns förlopp (se punkt 3).

Testrapport

Testrapporten ska innehålla följande information:

Sammanfattning

Testkemikalie:

— Källa, satsnummer, sista förbrukningsdag om detta anges.

— Testkemikaliens stabilitet, om den är känd.

Monokomponentämne:

— fysiskt utseende, vattenlöslighet och ytterligare relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper,

— kemiska beteckningar, såsom IUPAC- eller CAS-beteckning, CAS-nummer, SMILES- eller InChI-kod, strukturell formel, renhet, kemisk beteckning på föroreningar i förekommande fall och om möjligt osv.

Multikomponentämne, UVCB och blandningar:

— Karakteriseras så långt som möjligt genom kemisk beteckning (se ovan), kvantitativ förekomst och relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper hos beståndsdelarna.

Beredning av testkemikalien:

— Motivering för val av vehikel.

— Löslighet och stabilitet av testkemikalien i lösningsmedlet/vehikeln, om detta är känt.

— Beredning av foder-, dricksvatten- eller inandningsberedningar.

— Analytiska bestämningar av beredningar (t.ex. stabilitet, homogenitet, nominella koncentrationer, om sådana bereds.

Försöksdjur:

— Art/stam som används och motivering av valet.

— Djurens antal, ålder och kön.

— Ursprung, inhysning, foder etc.

— Metod för unik identifiering av djuren.

— För korttidsstudier: individuell vikt hos försöksdjuren vid försökets början och slutet av testet; för studier längre än en vecka: individuella kroppsvikter under studien och foderförbrukning. Kroppsviktsintervallet, medelvärde och standardavvikelse för varje grupp bör inkluderas.

▼M7

Testbetingelser:

— Positiva och negativa kontroller (vehikel/lösningsmedel).

— Data från en dosfinnande studie, om en sådan har utförts.

— Grund för valet av dosnivå.

— Uppgifter om beredning av testkemikalien.

— Uppgifter om administreringen av testkemikalien.

— Grund för administreringssätt och varaktighet.

— Metoder för att verifiera att testkemikalien nådde det stora kretsloppet eller benmärgen.

— Faktisk dos (mg/kg kroppsvikt/dag) som beräknats genom födans/dricksvattnets testkemikaliekoncentration (ppm) och konsumtion, i tillämpliga fall.

— Uppgifter om foder- och vattenkvalitet.

— Metod för avlivning.

— Smärtlindringsmetod (i förekommande fall).

— Detaljerad beskrivning av behandlings- och provtagningsscheman samt motivering av valen.

— Metoder för preparation av utstryksglas.

— Metoder för mätningar av toxicitet.

— Identitet för den metafashämmande kemikalien, koncentration, dos och tidpunkt för tillförsel före provtagning.

— Förfaranden för att isolera och bevara prover.

— Kriterier för hur avvikelser påvisas.

— Antal analyserade metafasceller per djur och antal analyserade celler för bestämning av mitotiskt index.

— Acceptanskriterier för undersökningen.

— Kriterier för att bedöma om undersökningarna är positiva, negativa eller ofullständiga.

Resultat:

— Djurens skick före och under hela testperioden, inklusive tecken på toxicitet.

— Mitotiskt index, angivet separat för varje djur.

— Typ och antal avvikelser och avvikande celler, angivna separat för varje djur.

— Totalt antal avvikelser per grupp med medelvärden och standardavvikelser.

— Antal celler med avvikelser per grupp med medelvärden och standardavvikelser.

— Förändringar i ploiditet om sådana påvisas, inklusive frekvenser för polyploida och/eller endoreduplicerade celler.

▼M7

— Dos/respons-förhållandet, där detta är möjligt.

— De statistiska analyser och metoder som använts.

— Uppgifter som styrker att exponering av benmärgen skedde.

— Parallella negativa och positiva kontrolldata, med omfattning, medelvärden och standardavvikelser.

— Historiska negativa och positiva kontrolldata med intervall, medelvärden, standardavvikelser och 95 % kontrollgränser för distribution, den tidsperiod som omfattas och antalet observationer.

— Kriterier som uppfyllts för positiv eller negativ respons.

Diskussion av resultaten.

Slutsatser

Litteraturhänvisningar

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. m.fl. (1987), Mammalian *in vivo* cytogenetic assays. Analysis of chromosome aberrations in bone marrow cells, Mutation Research, vol. 189/2, s. 157–165.

(4) Richold, M. m.fl. (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. m.fl. (1994), Report from the working group on the *in vivo* mammalian bone marrow chromosomal aberration test, Mutation Research, vol. 312/3, s. 305–312.

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

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

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

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

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

▼**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, s. 147–163.

(13) Lovell, D.P. m.fl. (1989), ”Statistical Analysis of *in vivo* Cytogenetic Assays”, in Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Report, Part III, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 184–232.

▼M7

Tillägg 1

DEFINITIONER

Aneuploidi: alla avvikelser från det normala antalet diploida (eller haploida) kromosomer med en eller flera kromosomer, men inte med hela uppsättningar kromosomer (jfr polyploidi).

Centromer: region på en kromosom där kärnspolefibrer är fästa under celldelning, vilket möjliggör en ordnad rörelse av dotterkromosomerna mot dottercellernas poler.

Kemikalie: ett ämne eller en blandning.

Avvikelse av kromatidtyp: strukturell kromosomskada uttryckt som brott på enstaka kromatider eller brott och återförening mellan kromatider.

Avvikelse av kromosomtyp: strukturell kromosomskada uttryckt som brott och återförening, på båda kromatiderna på samma ställe.

Endoreduplikation: en process där kärnan efter en S-fas under DNA-replikationen inte övergår i mitos utan inleder ännu en S-fas. Resultatet är kromosomer med 4,8,16,… kromatider.

Lucka: en akromatisk skada som är mindre än bredden på en kromatid, och med ett minimum av missanpassning hos kromatiderna.

Mitotiskt index: förhållandet mellan antalet celler i mitos och det totala antalet celler i en population, vilket är ett mått på cellpopulationens proliferationsstatus.

Numerisk avvikelse: en förändring av antalet kromosomer från det normala antalet karakteristiskt för det försöksdjur som används (aneuploidi).

Polyploidi: en numerisk kromosomavvikelse med en ändring av kromosomuppsättningens antal, jämfört med en numerisk ändring i en del av kromosomuppsättningen (jfr aneuploidi).

Strukturell kromosomavvikelse: en förändring i kromosomstrukturen som kan detekteras genom en mikroskopisk undersökning av celldelningens metafasstadium, och som uppträder i form av deletioner och fragment, interna eller externa utbyten.

Testkemikalie: alla ämnen eller blandningar som testas med denna testmetod.

▼M7

Tillägg 2

UTFORMNING AV FAKTORFÖRSÖK FÖR IDENTIFIERING AV SKILLNADER MELLAN KÖNEN I IN VIVO-TEST MED AVSEENDE PÅ KROMOSOMAVVIKELSER

Utformning och analys av faktorförsök

I denna utformning testas minst fem hanar och fem honor vid varje koncentrationsnivå, vilket innebär att minst 40 djur måste användas (20 hanar och 20 honor plus relevanta positiva kontroller).

Detta är ett av de enklaste faktorförsöken och det motsvarar en tvåvägs-variansanalys med kön och koncentrationsnivå som huvudsakliga effekter. Data kan analyseras med hjälp av många vanliga statistiska programvarupaket såsom SPSS, SAS, STATA, Genstat samt med hjälp av R.

Analysen delar upp variationen i datauppsättningen mellan kön, koncentrationer och interaktionen mellan kön och koncentrationer. Var och en av termerna testas mot en uppskattning av variationerna mellan replikatdjuren inom djurgrupper av samma kön som ges samma koncentration. Fullständig information om den underliggande metoden finns i många statistiska läroböcker (se litteraturhänvisningar) och i hjälpavsnitt i statistiska paket.

Nästa steg i analysen är att kontrollera interaktionstermen ”kön x koncentration” i ANOVA tabellen ([1]). I avsaknad av en signifikant interaktionsterm ger de kombinerade värdena mellan könen eller koncentrationsnivåerna giltiga statistiska test mellan nivåerna, baserat på den sammanslagna inomgruppsvariationen enligt ANOVA.

Nästa steg i analysen är att dela upp uppskattningen av variationen mellan koncentrationerna i kontraster, som möjliggör ett test avseende linjära och kvadratiska kontraster i responsen mellan koncentrationsnivåerna. Om en signifikant variation i kön x koncentration förekommer kan även denna term delas upp i interaktionskontraster enligt följande: linjära kontraster x kön och kvadratiska kontraster x kön. Med hjälp av dessa termer kan man testa om koncentrationsresponsen är parallell för de två könen eller om den skiljer sig åt.

Uppskattningen av den sammanslagna inomgruppsvariationen kan användas för parvisa test av skillnaderna mellan medelvärdena. Dessa jämförelser kan göras mellan medelvärdena för könen och medelvärdena för de olika koncentrationsnivåerna, t.ex. för jämförelser med de negativa kontrollnivåerna. Om det finns en signifikant interaktion kan man jämföra medelvärden för olika koncentrationer för samma kön eller medelvärden för båda könen vid samma koncentration.

Litteraturhänvisningar

Teori, utformning, metod, analys och tolkning av faktorförsök diskuteras i många statistiska läroböcker, från den enklaste tvåfaktorsanalysen till mer komplexa former som används i försöksutformningsmetoder. Följande förteckning är icke-uttömmande: Vissa böcker innehåller etablerade exempel på jämförbara utformningar, i vissa fall med koder för att köra analysen med hjälp av olika programvarupaket.

([1]) Statistiker som använder modelleringsmetoder som allmänna linjära modeller (GLM) kan använda analysen på ett annorlunda men jämförbart sätt. Det är inte nödvändigt att härleda den traditionella ANOVA-modellen, som bygger på algoritmiska metoder för statistisk beräkning som utvecklades före dataåldern..

▼M7

Box, G.E.P, Hunter, W.G. och 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. och 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. (1971). Statistical Principles in Experimental Design. McGraw Hill.

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

▼M7

B.12 MIKROKÄRNTEST AV ERYTROCYTER HOS DÄGGDJUR

INLEDNING

Den här testmetoden motsvarar OECD:s testriktlinje 474 (2016). Det är en del av en serie av testmetoder för genetisk toxikologi. Ett OECD-dokument som ger kortfattad information om tester inom genetisk toxikologi och en översikt över de senaste ändringarna av dessa testriktlinjer har utarbetats (1).

Mikrokärntest in vivo hos däggdjur är särskilt relevanta för att bedöma gentoxicitet, eftersom faktorer rörande in vivo-metabolism, farmakokinetik och DNA-reparationsprocesser är aktiva och bidrar till responsen, även om de varierar mellan arterna. Ett test in vivo är även användbart för fortsatta undersökningar av gentoxicitet, med detektion i ett in vitro-system.

Mikrokärntest in vivo hos däggdjur används för att detektera skador som testkemikalien inducerar på kromosomerna i den mitotiska funktionen hos erytroblaster. Testet utvärderar bildning av mikrokärnor i erytrocyter som antingen tas från benmärgen eller perifera blodceller hos djur, vanligen gnagare.

Avsikten med testet av mikrokärnor är att identifiera kemikalier som orsakar cytogen skada, vilket resulterar i bildning av mikrokärnor som antingen innehåller isolerade kromosomfragment eller hela kromosomer.

När en erytroblast från benmärg utvecklas till en omogen erytrocyt (ibland även kallad polykromatisk erytrocyt eller retikulocyt) stöts huvudkärnan ut. Eventuella mikrokärnor som har bildats kan stanna kvar i cytoplasman. Visualisering eller detektering av mikrokärnor underlättas i dessa celler eftersom de saknar en huvudkärna. En ökning av frekvensen av omogna erytrocyter med mikrokärnor hos behandlade försöksdjur utgör en indikation på inducerade strukturella eller numeriska kromosomavvikelser.

Nybildade erytrocyter med mikrokärnor identifieras och kvantifieras genom färgning, följt av antingen visuell klassificering med mikroskop eller genom automatisk analys. Ett tillräckligt stort antal erytrocyter måste räknas i perifert blod eller benmärgen hos vuxna djur. Räkningen underlättas avsevärt om man använder en automatisk klassificeringsplattform. Användningen av sådana plattformar är godtagbara alternativ till manuell utvärdering (2). Jämförande studier har visat att sådana metoder, med användning av lämpliga kalibreringsstandarder, kan ge bättre reproducerbarhet och sensitivitet inom laboratoriet än manuell klassificering med mikroskop (3) (4). Automatiska system som kan mäta frekvenser för erytrocyter med mikrokärnor är bland annat flödescytometrar (5), bildanalysplattformar (6) (7) och laserskanningcytometrar, även om det finns andra alternativ (8).

Även om det normalt inte görs under testet kan kromosomfragment särskiljas från hela kromosomer med hjälp av ett antal kriterier. Dessa innefattar identifiering av närvaron eller frånvaron av en kinetokor eller av centromer-DNA, som båda är karakteristiska för intakta kromosomer. Frånvaro av kinetokor eller av centromer-DNA tyder på att mikrokärnorna endast innehåller kromosomfragment, medan närvaro är ett tecken på kromosomförlust.

Definitioner av använd terminologi anges i tillägg 1.

▼M7

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN

Målvävnaden för genetisk skada i detta test är benmärg hos unga vuxna gnagare, eftersom erytrocyter bildas i denna vävnad. Mätning av mikrokärnor i omogna erytrocyter i perifert blod hos andra däggdjursarter är godtagbart om det har visats att arten är tillräckligt känslig för att detektera kemikalier som orsakar strukturella eller numeriska kromosomavvikelser hos dessa celler (genom induktion av mikrokärnor i omogna erytrocyter) och en vetenskaplig motivering ges. Frekvensen av omogna erytrocyter med mikrokärnor utgör den huvudsakliga slutpunkten. Frekvensen av mogna erytrocyter som innehåller mikrokärnor i perifert blod kan också användas som endpoint hos arter utan stark selektion i mjälten mot celler med mikrokärnor och när djuren behandlas kontinuerligt under en period som är längre än livslängden för erytrocyter hos den använda arten (t.ex. fyra veckor eller mer hos möss).

Om det finns bevis för att testkemikalien eller dessa metaboliter inte kommer att nå målvävnaden kan detta test vara olämpligt att använda.

Innan testmetoden används på en blandning i syfte att samla in data för ett lagstadgat ändamål bör man överväga om, och i så fall varför, den kommer att ge godtagbara resultat för det syftet. Sådana överväganden är inte nödvändiga om blandningen måste provas enligt lag.

TESTMETODENS PRINCIP

Försöksdjuren exponeras för testkemikalien på ett lämpligt sätt. Om benmärg används bör försöksdjuren avlivas humant vid en lämplig tidpunkt efter behandling, varvid benmärgen extraheras och beredningar görs och färgas (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15). Om perifert blod används samlas blodet upp vid lämpliga tidpunkter efter behandling och beredningar görs, vilka sedan färgas in (12) (16) (17) (18). När behandlingen ges akut är det viktigt att välja lämpliga tidpunkter för skörd av benmärg eller blod så att behandlingsrelaterad induktion av omogna erytrocyter kan detekteras. Vid provtagning av perifert blod måste tillräckligt lång tid ha gått för att dessa händelser ska vara synliga i det cirkulerande blodet. Beredningarna analyseras med avseende på närvaro av mikrokärnor, antingen genom visualisering med användning av mikroskop, bildanalys, flödescytometri eller laserskanningcytometri.

KVALIFIKATIONSPRÖVNING AV LABORATORIET

Kvalifikationsprövning

För att fastställa att det finns tillräcklig erfarenhet av testet innan det används för rutintestning bör laboratoriet visa sin förmåga att reproducera förväntade resultat från publicerade data (17) (19) (20) (21) (22) för frekvenser av mikrokärnor med minst två positiva kontrollkemikalier (inklusive svag respons som induceras av låga doser av positiva kontroller) enligt tabell 1 och med förenliga vehikel-/lösningsmedelskontroller (se punkt 26). I försöken bör man använda doser som ger reproducerbara och dosrelaterade ökningar och visar testsystemets sensitivitet och dynamiska omfång när det gäller den berörda vävnaden (benmärg eller perifert blod), med användning av den klassificeringsmetod som laboratoriet tillämpar. Detta gäller inte laboratorier som redan har erfarenhet, dvs. har en historisk databas enligt punkterna 14–18.

Historiska kontrolldata

Laboratoriet bör fastställa följande i kvalifikationsprövningen:

— Ett historiskt positivt kontrollintervall och fördelning.

▼M7

— Ett historiskt negativt kontrollintervall och fördelning.

Om data för en historisk negativ kontrollfördelning samlas in först bör de parallella negativa kontrollerna överensstämma med publicerade kontrolldata om sådana finns. Allteftersom den historiska kontrollfördelningen kompletteras med fler försöksdata bör de parallella negativa kontrollerna i idealfallet ligga inom fördelningens kontrollgräns på 95 %. Laboratoriets historiska negativa kontrolldatabas bör vara statistiskt robust för att säkerställa laboratoriets förmåga att bedöma fördelningen av negativa kontrolldata. Enligt litteraturen kan minst 10 försök behövas, men databasen bör helst bestå av minst 20 försök utförda under jämförbara försöksbetingelser. Laboratorierna bör använda kvalitetskontrollmetoder såsom kontrolldiagram (t.ex. C-diagram eller X-stapeldiagram (23)), för att fastställa hur variabla deras data är och för att visa att metoden är ”under kontroll”. Fler rekommendationer om hur man bygger upp och använder historiska kontrolldatabaser (t.ex. kriterier för att innefatta och utesluta data samt acceptanskriterier för ett givet försök) finns i litteraturen (24).

Om laboratoriet inte slutför ett tillräckligt antal försök för att fastställa en statistiskt robust negativ kontrollfördelning (se punkt 15) under kompetensundersökningarna (beskrivs i punkt 13) kan fördelningen byggas upp under de första rutintesterna. Denna strategi bör följa rekommendationerna i litteraturen (24) och de negativa kontrollresultat som erhållits i dessa experiment bör överensstämma med publicerade negativa kontrolldata.

Eventuella ändringar av försöksprotokollen bör övervägas för att se till att resulterande data fortfarande överensstämmer med laboratoriets befintliga historiska kontrolldatabas. Endast stora inkonsekvenser bör leda till upprättandet av en ny historisk kontrolldatabas om en fackgranskning fastslår att den skiljer sig från den föregående fördelningen (se punkt 15). Om en ny databas byggs upp kanske inte en fullständig negativ kontrolldatabas behövs för att utföra ett faktiskt test, under förutsättning att laboratoriet kan visa att dess parallella negativa kontrollvärden fortfarande överensstämmer med den tidigare databasen eller motsvarande publicerade data.

Negativa kontrolldata bör bestå av förekomsten av omogna erytrocyter med mikrokärnor hos varje djur. Parallella negativa kontroller bör helst ligga inom kontrollgränsen på 95 % för fördelningen av laboratoriets historiska negativa kontrolldatabas. Om parallella negativa kontrolldata faller utanför kontrollgränserna på 95 % kan de ändå ingå i den historiska kontrollfördelningen så länge de inte är extremt avvikande och det finns bevis för att testsystemet är under kontroll (se punkt 15) och att inga tekniska eller mänskliga fel begåtts.

BESKRIVNING AV TESTMETODEN

Förberedelser

Val av djurart

Unga och friska vuxna exemplar som härrör från normala laboratoriestammar. Möss, råttor eller andra lämpliga däggdjursarter kan användas. När perifert blod används måste det fastställas att avlägsnandet av celler med mikrokärnor i mjälten från cirkulationen inte gör det svårare att detektera inducerade mikrokärnor i de arter som valts ut. Detta har tydligt visats hos perifert blod från möss och

▼M7

råttor (2). Om andra arter än råttor och möss används bör en vetenskaplig motivering lämnas i rapporten. Om andra arter än gnagare används bör mätningen av inducerade mikrokärnor integreras i ett annat lämpligt toxicitetstest.

Inhysnings- och utfodringsförhållanden

För gnagare bör temperaturen i försöksdjurens rum vara 22 °C (± 3 °C). Den relativa fuktigheten bör helst vara 50–60 %, men minst 40 % och bör helst inte överstiga 70 % utom när rummet rengörs. Artificiell belysning bör användas, med en dygnsrytm på 12 timmar ljus och 12 timmar mörker. För utfodring kan konventionellt laboratoriefoder användas med obegränsad tillgång till dricksvatten. Valet av foder kan påverkas av behovet av att säkerställa en lämplig blandning av en testkemikalie när den administreras genom denna väg. Gnagare bör hållas i små grupper (högst fem per bur) av samma kön och behandlingsgrupp, om inget aggressivt beteende kan förväntas, företrädesvis i fasta golvburar med lämplig miljöberikning. Djuren får endast hållas individuellt om det är vetenskapligt motiverat.

Förberedelse av djuren

Normalt används friska unga vuxna djur (6–10 veckor gamla vid behandlingsstarten, även om något äldre djur också är godtagbara) som slumpvis väljs ut till kontroll- och behandlingsgrupperna. Djuren ska ha en unik identifiering som appliceras med en human och minimalt invasiv metod (t.ex. ringmärkning, taggar, mikrochip eller biometrisk identifiering, men inte öron- eller tassclips). De bör vänjas vid förhållandena i laboratoriet under minst fem dagar. Burarna bör placeras i sådan ordning att eventuella verkningar på grund av placeringen minimeras. Korskontaminering av den positiva kontrollen och testkemikalien bör undvikas. Vid undersökningens början bör viktskillnaderna mellan försöksdjuren vara minimal och inte överstiga ± 20 % av medelvikten för varje kön.

Beredning av doser

Fasta testkemikalier bör lösas upp i, eller blandas med, lämpliga lösningsmedel eller vehiklar eller blandas i foder eller dricksvatten innan dosen administreras till djuren. Testkemikalier i flytande form kan doseras direkt eller spädas ut före doseringen. Vid inhalationexponering kan testkemikalier administreras såsom gas, ånga eller en fast/flytande aerosol, beroende på deras fysikalisk-kemiska egenskaper. Nygjorda beredningar av testkemikalien bör användas om inte stabilitetsdata visar att lagringen är acceptabel och lämpliga lagringsförhållanden bör fastställas.

Testbetingelser

Lösningsmedel/vehikel

Lösningsmedlet/vehikeln bör inte ge upphov till toxiska effekter vid de dosnivåer som används och bör inte kunna reagera kemiskt med testsubstansen. Om andra lösningsmedel/vehiklar än gängse brukliga används bör det finnas referensdata som visar att de är kompatibla. När det är möjligt, rekommenderas att man i första hand överväger vattenbaserade lösningsmedel/vehiklar. Exempel på vanliga kompatibla lösningsmedel/vehiklar är vatten, fysiologisk saltlösning, metylcellulosalösning, karboximetylcellulosa natriumsaltlösning, olivolja och majsolja. I avsaknad av historiska eller publicerade kontrolldata som visar att inga effekter på mikrokärnor eller andra skadliga effekter induceras av det valda lösningsmedlet/vehikeln bör en preliminär undersökning utföras för att fastställa acceptansen för vehikelkontrollen.

▼M7

Kontroller

Positiva kontroller

En grupp djur som behandlas med en positiv kontrollkemikalie bör normalt ingå i varje test. Denna regel kan frångås om testlaboratoriet har visat att det är kvalificerat att utföra testet och har fastställt ett historiskt positivt kontrollintervall. Om en parallell positiv kontrollgrupp inte ingår bör klassificeringskontroller (fixerade och ofläckade utstryksglas eller prover med cellsuspensioner, beroende på vad som är lämpligt för klassificeringsmetoden) inkluderas i varje försök. Detta kan åstadkommas genom att inbegripa lämpliga referensprover i klassificeringen av undersökningen som har erhållits och lagrats från ett separat positivt kontrollförsök som utförs med jämna mellanrum (.tex var 6:e till 18 månad), t.ex. under kvalifikationsprövning och vid behov med jämna mellanrum därefter.

Positiva kontrollkemikalier bör på ett tillförlitligt sätt ge en detekterbar ökning i frekvensen av mikrokärnor över den spontana nivån. Om klassificeringen görs manuellt med mikroskop bör positiva kontrolldoser väljas på ett sådant sätt att effekterna är tydliga men inte omedelbart avslöjar identiteten hos de kodade proverna för bedömaren. Det är acceptabelt att den positiva kontrollen administreras via en annan tillförselväg än testkemikalien och enligt ett annat behandlingsschema, och att provtagningen endast sker vid ett tillfälle. Dessutom kan användningen av kemiska klassrelaterade positiva kontrollkemikalier övervägas i förekommande fall. Exempel på positiva kontrollkemikalier ges i tabell 1.

Tabell 1

Exempel på positiva kontrollkemikalier.

Kemikalier och CASRN
Etylmetansulfonat [CASRN 62-50-0]
Metylmetansulfonat [CASRN 66-27-3]
Etylnitrosourea [CASRN 759-73-9]
Mitomycin C [CASRN 50-07-7]
Cyklofosfamid (monohydrat) [CASRN 50-18-0 (CASRN 6055-19-2)]
Trietylenmelamin [CASRN 51-18-3]
Colchicin [CASRN 64-86-8] eller vinblastin [CASRN 865-21-4] – som aneugens

Negativa kontroller

Djur från den negativa kontrollgruppen bör inkluderas vid varje provtagningstillfälle och i övrigt hanteras på samma sätt som behandlingsgrupperna, med undantag för att de inte behandlas med testkemikalien. Om lösningsmedel/vehikel används för att tillföra testkemikalien bör kontrollgruppen tillföras lösningsmedlet/vehikeln. Om testlaboratoriet påvisar konsekventa variationer mellan djur och frekvenser av celler med mikrokärnor genom historiska negativa kontrolldata vid varje provtagningstillfälle kan det dock vara tillräckligt med en enda provtagning för den negativa kontrollen. Om en enda provtagning används för negativa kontroller bör den vara det första provtagningstillfället i undersökningen.

▼M7

Om perifert blod används är ett förbehandlat prov godtagbart i stället för en parallell negativ kontroll för kortvariga undersökningar om de resulterande uppgifterna överensstämmer med testlaboratoriets historiska kontrolldatabas. Det har visats att förbehandling av prov med små volymer (t.ex. under 100 µl/dag) hos råttor har en minimal inverkan på bakgrundsfrekvensen av mikrokärnor (25).

FÖRFARANDE

Djurens antal och kön

I regel är mikrokärnornas respons liknande mellan han- och hondjur och de flesta undersökningar kan därför utföras på endera könet (26). Om det finns data som visar på relevanta skillnader mellan hanar och honor (t.ex. skillnader i systemisk toxicitet, metabolism, biotillgänglighet, benmärgstoxicitet osv., inklusive ett preliminärt test) bör båda könen användas. I detta fall kan det vara lämpligt att göra en undersökning av båda könen, t.ex. som en del av en upprepad dostoxicitetsundersökning. Om båda könen används kan ett faktorförsök vara lämpligt. En närmare beskrivning av hur man analyserar data med användning av faktorförsök ges i tillägg 2.

Gruppernas storlek vid försöksstarten bör fastställas. Målet bör vara minst fem analyserbara djur av ett kön, eller av vardera könet om båda används, per grupp. I de fall där exponering av människa för kemikalier kan ge könsspecifika resultat, som t.ex. för vissa läkemedel, bör testet utföras med försöksdjur av lämpligt kön. Som en vägledning för ett vanligt krav på maximalt antal djur skulle det krävas 25–35 djur för en benmärgsundersökning som utförs enligt de parametrar som fastställs i punkt 37, med tre dosgrupper och parallella negativa och positiva kontrollgrupper (fem djur av ett kön i varje grupp).

Dosnivåer

Om det inte finns några lämpliga data tillgängliga och en undersökning därför utförs för att fastställa omfattningen, bör denna undersökning utföras i samma laboratorium, och med samma arter, stammar, kön och behandlingsschema som senare ska användas i huvudundersökningen (27). Syftet med undersökningen bör vara att identifiera högsta tolererbara dos (MTD), som definieras som den dos som tolereras utan bevis för toxicitet som begränsar undersökningen i förhållande till dess varaktighet (t.ex. genom att inducera minskad kroppsvikt eller hematopoietisk systemcytotoxicitet, men inte dödlighet eller tecken på smärta, lidande eller ångest som kräver human avlivning (28)).

Den högsta dosen kan även definieras som en dos vilken ger upphov till toxicitet i benmärgen (t.ex. en reduktion av andelen omogna erytrocyter jämfört med det totala antalet erytrocyter i benmärgen eller i perifert blod på mer än 50 % men inte mindre än 20 % av kontrollvärdet). Om man analyserar CD71-positiva celler i den perifera blodcirkulationen (dvs. genom flödescytometri) reagerar denna mycket unga fraktion av omogna erytrocyter dock mycket snabbare på toxiska utmaningar än större RNA-positiva kohorter av omogna erytrocyter. Därför kan en skenbart högre toxicitet framträda i utformningar med akut exponering som undersöker CD71-positiva fraktioner av omogna erytrocyter jämfört med undersökningar som identifierar omogna erytrocyter baserat på RNA-innehåll. Om försökens behandlingstider är fem dagar eller kortare kan därför den högsta dosnivån för testkemikalier som orsakar toxicitet definieras som den dos som ger en statistiskt signifikant minskning av andelen CD71-positiva omogna erytrocyter av det totala antalet erytrocyter, men inte mindre än 5 % av kontrollvärdet (29).

▼M7

Kemikalier som uppvisar mättnad av toxikokinetiska egenskaper eller inducerar avgiftningsprocesser som kan leda till minskad exponering efter långtidstillförsel kan vara undantag från kriterierna för dosbestämning och bör utvärderas från fall till fall.

För att inhämta data om dosrespons bör en fullständig undersökning omfatta en negativ kontrollgrupp och minst tre dosnivåer som vanligen skiljer sig med en faktor 2, men inte högre än 4. Om testkemikalien inte orsakar toxicitet i en preliminär undersökning eller baserat på befintliga uppgifter är den högsta dosen 1 000 mg/kg/kroppsvikt/dag för administrationsperioder på 14 dagar eller 2 000 mg/kg/kroppsvikt/dag för administrationsperioder på mindre än 14 dagar. Om testkemikalien orsakar toxicitet bör MTD vara den högsta dosen och de dosnivåer som används bör helst omfatta ett intervall från maxdos till en dos som producerar liten eller ingen toxicitet. När toxicitet i målvävnaden (benmärg) observeras vid alla testade dosnivåer rekommenderas fortsatta undersökningar med icke-toxiska doser. Undersökningar som syftar till att mer grundligt karakterisera kvantitativ information om dosrespons kan kräva ytterligare dosgrupper. Dessa gränser kan variera för vissa typer av testkemikalier (t.ex. humanläkemedel) som omfattas av särskilda krav.

Toleranstest

Om försök för att fastställa dosering eller befintliga data från besläktade djurstammar tyder på att ett behandlingssystem med minst gränsdosen (beskrivs nedan) inte ger några observerbara toxiska effekter (ingen minskning av benmärgens proliferation eller andra bevis på cytotoxicitet i målvävnaden), och om ingen gentoxicitet förväntas baserat på in vitro-undersökningar av gentoxicitet eller data från strukturellt besläktade kemikalier, anses det kanske inte nödvändigt med ett fullständigt test med tre dosnivåer, under förutsättning att det har påvisats att testkemikalien når målvävnaden (benmärg). I sådana fall kan en enda dosnivå, vid gränsdosen, vara tillräcklig. För administrationsperioder på 14 dagar eller mer är gränsdosen 1 000 mg/kg/kroppsvikt/dag. För administrationsperioder på mindre än 14 dagar är gränsdosen 2 000 mg/kg/kroppsvikt/dag.

Tillförsel av doser

Den förväntade exponeringsvägen för människor bör beaktas vid utformningen av en analys. Därför kan exponeringsvägar (t.ex. föda, dricksvatten, lokalt subkutant, intravenöst, oralt (via sond), inhalation, intratrakealt eller implantation) väljas som motiverad exponering. Exponeringsvägen bör i alla händelser väljas för att säkerställa lämplig exponering av målvävnaden. Intraperitoneal injektion rekommenderas generellt inte eftersom den inte är en avsedd exponeringsväg för människor, och bör endast användas med specifik vetenskaplig motivering. Om testkemikalien blandas i födan eller dricksvattnet bör man, särskilt i fråga om engångsdosering, se till att fördröjningen mellan födo- och vattenintag och provtagning är tillräcklig för att upptäcka effekterna (se punkt 37). Den maximala vätskevolymen som kan administreras genom sondmatning eller injektion vid ett tillfälle beror på försöksdjurets storlek. Volymen bör normalt inte överstiga 1 ml per 100 g kroppsvikt, utom för vattenlösningar där högst 2 ml/100 g får användas. Användning av volymer som är större än den bör motiveras. Med undantag för irriterande eller frätande testkemikalier, som normalt kommer att ge stegrade verkningar vid högre koncentrationer, bör variationer av testvolymen minimeras genom justering av koncentrationen för att säkerställa att en konstant volym ges i förhållande till kroppsvikten vid alla dosnivåer.

▼M7

Behandlingsschema

Företrädesvis utförs två eller fler behandlingar som ges i 24-timmarsintervaller, särskilt om detta test integreras i andra toxicitetsundersökningar. Alternativt kan enstaka behandlingar ges om det är vetenskapligt motiverat (om det t.ex. är känt att testkemikalien blockerar cellcykeln). Testkemikalierna kan också ges som en enstaka behandling, men kan även ges som en delad dos (dvs två eller flera behandlingar samma dag med högst 2–3 timmars mellanrum) för att underlätta tillförsel av stora volymer. Under dessa omständigheter eller när tillförseln av testkemikalien sker via inhalation bör provtagningstiden planeras baserat på tidpunkten för den sista doseringen eller när exponeringen upphör.

Testet kan utföras på möss eller råttor på ett av följande tre sätt:

a. Djuren behandlas med testkemikalien en gång. Prover på benmärg tas ut minst två gånger (från oberoende djurgrupper) med början tidigast 24 timmar men senast 48 timmar efter behandling och med passande intervall mellan proven, om inte testkemikalien är känd för att ha en exceptionellt lång halveringstid. Om prover tas tidigare än 24 timmar efter behandling bör detta motiveras. Prover på perifert blod tas ut minst två gånger (från samma grupp av djur), med början tidigast 36 timmar efter behandling, och med passande intervall efter det första provet, men inte senare än efter 72 timmar. Vid det första provtagningstillfället bör alla dosgrupper behandlas och prover samlas in för analys. Vid senare provtagningstillfälle(n) behöver endast den högsta dosen ges. När ett positivt svar identifieras vid ett provtagningstillfälle är ytterligare provtagning inte nödvändig om inte kvantitativ dos-responsinformation behövs. De beskrivna skördetidpunkterna är följden av kinetiken, dvs. hur mikrokärnorna framträder och försvinner i de två vävnadsdelarna.

b. Om två dagliga behandlingar utförs (t.ex. två behandlingar med 24 timmars intervall), bör prover tas ut en gång mellan 18 och 24 timmar efter den slutliga behandlingen av benmärgen eller en gång mellan 36 och 48 timmar efter den slutliga behandlingen av det perifera blodet (30). De beskrivna skördetidpunkterna är följden av kinetiken, dvs. hur mikrokärnorna framträder och försvinner i de två vävnadsdelarna.

c. Om tre eller fler dagliga behandlingar utförs (t.ex. tre eller flera behandlingar med cirka 24 timmars intervall) bör benmärgsprov samlas in senast 24 timmar efter den sista behandlingen och perifert blod samlas in senast 40 timmar efter den sista behandlingen (31). Detta behandlingsalternativ utgör en kombination av Comet Assay (t.ex. provtagning 2–6 timmar efter den sista behandlingen) och mikrokärntestet, vilket integreras i toxicitetsundersökningar med upprepade doser. Befintliga uppgifter tyder på att induktion av mikrokärnor kan observeras under dessa längre tidsramar när testkemikalien har tillförts tre eller fler gånger (15).

Andra doserings- eller provtagningssystem kan användas när det är relevant, vetenskapligt motiverat och underlättar integration med andra toxicitetstester.

Observationer

Allmänna kliniska observationer av testdjuren bör göras och kliniska tecken registreras minst en gång per dag, helst vid samma tidpunkt med hänsyn till maximalt förväntade effekter efter doseringen. Djuren bör observeras minst två gånger dagligen under doseringsperioden beträffande morbiditet och mortalitet. Alla djur bör vägas när undersökningen inleds, åtminstone en gång i veckan under undersökningar med upprepad dosering och vid avlivning. För undersökningar som varar minst en vecka bör mätning av foderkonsumtion göras minst en

▼M7

gång i veckan. Om testkemikalien tillförs via dricksvattnet bör även vattenkonsumtionen mätas vid varje byte av vatten och minst en gång i veckan. Djur som uppvisar icke-dödliga indikatorer på överskottstoxicitet bör avlivas på ett humant sätt innan testperiodens slut (28). Under vissa omständigheter kan djurens kroppstemperatur övervakas, eftersom det är känt att hyper- och hypotermi till följd av behandling ger felaktiga resultat (32) (33) (34).

Exponering av målvävnaden

Blodprov tas vid lämpliga tidpunkter för att möjliggöra undersökningar av testkemikaliens plasmanivåer. Syftet med detta är att visa att benmärgen har exponerats om så krävs och om det inte finns andra exponeringsdata (se punkt 48).

Preparation av benmärg/blod

Benmärgsceller erhålls vanligen från lårbenet eller skenbenet omedelbart efter det att djuret avlivats på ett humant sätt. Normalt avlägsnas cellerna, prepareras och färgas in med hjälp av etablerade metoder. Små volymer av perifert blod kan erhållas enligt lämpliga djurskyddsnormer, antingen med hjälp av en metod där testdjuret överlever, t.ex. blödning från svansådern eller något annat lämpligt blodkärl, eller genom hjärtpunktering eller provtagning från ett stort blodkärl vid avlivning. Både för erytrocyter från benmärg och perifert blod, beroende på analysmetod, kan cellerna färgas in omedelbart supravitalt (16) (17) (18). Utstrykspreparat görs och färgas sedan in för mikroskopundersökning eller fixeras och färgas på lämpligt sätt för analys med flödescytometri. Användningen av ett DNA-specifikt färgämne (t.ex. akridinorange (35) eller Hoechst 33258 plus pyronin-Y (36)) kan eliminera några av de artefakter som ar associerade med användning av ett färgämne som inte är DNA-specifikt. Denna fördel utesluter inte användningen av konventionella färgämnen (t.ex. Giemsa för mikroskopanalys). Ytterligare system (t.ex. cellulosakolonner för att avlägsna celler med kärnor (37) (38) kan även användas, förutsatt att dessa system har visat sig vara förenliga med beredningen av prov i laboratoriet.

Om sådana metoder är tillämpliga kan system med anti-kinetokor-antikroppar (39), FISH-teknik med pancentromera DNA-prober (40) eller primad in situ-märkning med pancentromerspecifik primer, tillsammans med lämplig DNA-motfärgning (41), användas för att identifiera mikrokärnans karaktär (kromosom/kromosomfragment) för att fastställa om induktionen av mikrokärnor beror på klastogen och/eller aneugen aktivitet. Andra metoder för differentiering mellan klastogener och aneugener kan användas om de har visat sig vara effektiva.

Analys (manuell och automatisk)

Alla utstryksglas eller analysprover, inklusive glasen från de positiva och negativa kontrollerna, bör ges en oberoende kodning före analysen och bör randomiseras så att den manuella bedömaren inte känner till behandlingsbetingelserna. Kodning är inte nödvändig vid användning av automatiska klassificeringssystem som inte bygger på visuell kontroll och inte kan påverkas av bedömarens förutfattade mening. Andelen omogna erytrocyter bland det totala antalet erytrocyter (omogna + mogna) bestäms för varje djur genom att totalt räkna minst 500 erytrocyter för benmärg och 2 000 erytrocyter för perifert blod (42). Minst 4 000 omogna erytrocyter per djur bör undersökas med avseende på förekomst av omogna erytrocyter med mikrokärnor (43). Om den historiska databasen över negativa kontroller visar att bakgrundsmedelvärdet för frekvensen för omogna erytrocyter i mikrokärnor är < 0,1 % på testlaboratoriet bör man överväga att klassificera ytterligare celler. När proverna analyseras bör andelen omogna erytrocyter jämfört med det totala antalet erytrocyter hos de behandlade djuren inte vara mindre än 20 % av andelen vehikel-/lösningskontroll vid klassificering med mikroskop, och inte mindre än cirka 5 % av andelen vehikel-/lösningskontroll när

▼M7

CD71 + omogna erytrocyter klassificeras med cytometriska metoder (se punkt 31) (29). Exempel: I ett försök med benmärg som klassificeras med mikroskop där kontrollandelen omogna erytrocyter i benmärgen uppgår till 50 % skulle den övre toxicitetsgränsen vara 10 % omogna erytrocyter.

Råttans mjälte isolerar och förstör erytrocyter med mikrokärnor. För att upprätthålla en hög sensitivitet vid analyser av perifert blod från råttor bör analysen av omogna erytrocyter med mikrokärnor därför begränsas till den yngsta fraktionen. Vid användning av automatiska analysmetoder kan de mest omogna erytrocyterna identifieras via deras höga RNA-halt eller den höga nivån av transferrinreceptorer (CD71+), uttryckt på deras yta (31). En direkt jämförelse av olika färgningsmetoder har dock visat att tillfredsställande resultat kan erhållas med olika metoder, inklusive konventionell färgning med akridinorange (3) (4).

DATA OCH RAPPORTERING

Behandling av resultaten

Individuella djurdata bör presenteras i tabellform. Antalet omogna erytrocyter som påträffas, antalet omogna erytrocyter med mikrokärnor, och andelen omogna bland det totala antalet erytrocyter bör listas separat för varje djur som analyseras. Om möss behandlas kontinuerligt under fyra veckor eller mer bör även uppgifter om antal och andel mogna erytrocyter med mikrokärnor anges om sådana uppgifter samlas in. Uppgifter om toxicitet för djur och kliniska tecken bör också rapporteras.

Kriterier för godkännande

Följande kriterier avgör om testet är godtagbart:

a. Parallella negativa kontrolldata anses godtagbara för registrering i laboratoriets historiska databas (se punkterna 15–18).

b. Parallella positiva kontroller eller klassificeringskontroller bör framkalla reaktioner som överensstämmer med de kontroller som genereras i den historiska databasen över positiva kontroller och ge en statistiskt signifikant ökning jämfört med den parallella negativa kontrollen (se punkterna 24–25).

c. Ett lämpligt antal doser och celler har analyserats.

d. Urvalskriterierna för högsta dos överensstämmer med de kriterier som beskrivs i punkterna 30–33.

Utvärdering och tolkning av resultaten

Under förutsättning att samtliga acceptanskriterier är uppfyllda anses testkemikalien vara klart positiv om följande gäller:

a. Åtminstone en av behandlingsgrupperna uppvisar en statistiskt signifikant ökning av frekvensen av omogna erytrocyter med mikrokärnor jämfört med den parallella negativa kontrollen.

b. Ökningen är dosrelaterad vid minst ett provtagningstillfälle när den utvärderas med ett lämpligt trendtest.

c. Något av resultaten ligger utanför fördelningen av historiska negativa kontrolldata (t.ex. Poisson-baserade 95 %-kontrollgränser.

▼M7

Om endast den högsta dosen undersöks vid ett visst provtagningstillfälle anses en testkemikalie vara klart positiv om det finns en statistiskt säkerställd ökning jämfört med den parallella negativa kontrollen och resultaten ligger utanför fördelningen av historiska negativa kontrolldata (t.ex. Poisson-baserade 95 %-kontrollgränser). Rekommendationer om de lämpligaste statistiska metoderna finns i litteraturen (44) (45) (46) (47). Om en dos-responsanalys genomförs bör minst tre behandlade dosgrupper analyseras. Statistiska tester som används bör betrakta djuret som den experimentella enheten. Positiva resultat i testet av mikrokärnor tyder på att testkemikalien inducerar mikrokärnor som är ett resultat av en kromosomskada eller skada på den mitotiska apparaten i erytroblasterna hos den art som testas. Om ett test utfördes för att detektera centromerer i mikrokärnorna är en testkemikalie som producerar mikrokärnor med centromerer (centromerisk DNA eller kinetokor, som visar på fullständig kromosomförlust) bevis på att testkemikalien är en aneugen.

Under förutsättning att samtliga acceptanskriterier är uppfyllda anses testkemikalien vara klart negativ om följande gäller för samtliga undersökta försöksbetingelser:

a. Ingen av behandlingsgrupperna uppvisar en statistiskt signifikant ökning av frekvensen av omogna erytrocyter med mikrokärnor jämfört med den parallella negativa kontrollen.

b. Ingen dosrelaterad ökning förekommer vid något provtagningstillfälle vid utvärdering med ett lämpligt trendtest.

c. Alla resultat ligger inom fördelningen av historiska negativa kontrolldata (t.ex. Poisson-baserade 95 %-kontrollgränser.

d. Benmärgen exponerades för testkemikalien.

Rekommendationer om de lämpligaste statistiska metoderna finns i litteraturen (44) (45) (46) (47). Bevis för att benmärgen exponerats för en testkemikalie kan vara en minskning av förhållandet mellan omogna och mogna erytrocyter eller mätningar av plasma- och blodnivåerna i förhållande till testkemikalien. Vid intravenös tillförsel behövs inga bevis på exponering. Alternativt kan ADME-data, som erhållits i en oberoende undersökning med samma exponeringsväg och samma arter, användas för att visa benmärgsexponering. Negativa resultat indikerar att testkemikalien, under dessa försöksbetingelser, inte ger upphov till mikrokärnor i de omogna erytrocyterna hos den art som testas.

Det finns inget krav på verifiering av ett tydligt positivt eller negativt svar.

Om responsen varken är klart negativ eller klart positiv och för att göra det lättare att fastställa resultatets biologiska relevans (t.ex. en svag ökning eller en ökning som ligger på gränsen) bör de försök som slutförts fackgranskas och/eller undersökas ytterligare. I vissa fall kan analys av fler celler eller ett upprepat försök med modifierade försöksbetingelser vara användbart.

I sällsynta fall är det inte möjligt att dra en slutsats om huruvida testkemikalien ger positiva eller negativa resultat trots ytterligare undersökningar, och i dessa fall anses undersökningen vara tvetydig.

Testrapport

Testrapporten ska innehålla följande information:

Sammanfattning

Testkemikalie:

— Källa, partinummer, sista förbrukningsdag om detta anges.

▼M7

— Testkemikaliens stabilitet, om den är känd.

Monokomponentämne:

— Fysiskt utseende, vattenlöslighet och ytterligare relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper.

— Kemiska beteckningar, såsom IUPAC- eller CAS-beteckning, CAS–nummer, SMILES- eller InChI-kod, strukturell formel, renhet, kemisk beteckning på föroreningar i förekommande fall och om möjligt osv.

Multikomponentämne, UVCB och blandningar:

— Karakteriseras så långt som möjligt genom kemisk beteckning (se ovan), kvantitativ förekomst och relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper hos beståndsdelarna.

Beredning av testkemikalien:

— motivering för val av vehikel,

— löslighet och stabilitet av testkemikalien i lösningsmedlet/vehikeln, om detta är känt,

— beredning av foder-, dricksvatten- eller inandningsberedningar,

— analytiska bestämningar av beredningar (t.ex. stabilitet, homogenitet, nominella koncentrationer) om sådana görs,

Försöksdjur:

— Art/stam som används och motivering av valet.

— Djurens antal, ålder och kön.

— Ursprung, inhysning, foder osv.

— Metod för unik identifiering av djuren.

— För korttidsundersökningar: individuell vikt hos försöksdjuren vid testets början och slut, för undersökningar som pågår längre än en vecka: individuella kroppsvikter under undersökningen samt foderkonsumtion, kroppsviktsintervall samt medelvärde och standardavvikelse för varje grupp bör inkluderas.

Testbetingelser:

— Positiva och negativa kontrolldata (vehikel/lösningsmedel).

— Data från en preliminär undersökning, om en sådan har utförts.

— Grund för valet av dosnivå.

— Uppgifter om beredning av testkemikalien.

— Uppgifter om administreringen av testkemikalien.

— Grund för administreringsväg och varaktighet.

— Metoder för att verifiera att testkemikalien nådde det stora kretsloppet eller målvävnaden.

▼M7

— Faktisk dos (mg/kg kroppsvikt/dag) som beräknats genom dietens/dricksvattnets testkemikaliekoncentration (ppm) och konsumtion, i tillämpliga fall.

— Uppgifter om foder- och vattenkvalitet.

— Metod för avlivning.

— Smärtlindringsmetod (i förekommande fall).

— Detaljerad beskrivning av behandlings- och provtagningsscheman samt motivering av valen.

— Metoder för preparation av utstryksglas.

— Förfaranden för att isolera och bevara prover.

— Metoder för mätningar av toxicitet.

— Kriterier för bestämning av omogna erytrocyter med mikrokärnor.

— Antal analyserade celler per djur för bestämning av frekvensen av omogna erytrocyter i mikrokärnor samt andelen omogna erytrocyter jämfört med andelen mogna erytrocyter.

— Acceptanskriterier för undersökningen.

— Metoder, såsom användning av anti-kinetokor-antikroppar eller centromerspecifika DNA-prober, för att fastställa om mikrokärnorna innehåller hela eller fragmenterade kromosomer, om tillämpligt.

Resultat:

— Djurens skick före och under hela testperioden, inklusive tecken på toxicitet.

— Andelen omogna erytrocyter av det totala antalet erytrocyter.

— Antalet omogna erytrocyter med mikrokärnor, angett separat för varje djur.

— Medelvärde ± standardavvikelse för omogna erytrocyter med mikrokärnor per grupp.

— Dos/respons-förhållandet, där detta är möjligt.

— De statistiska analyser och metoder som användes.

— Parallella negativa och positiva kontrolldata, med omfattning, medelvärden och standardavvikelser.

— Historiska negativa och positiva kontrolldata med intervall, medelvärden, standardavvikelser och 95 % kontrollgränser för distribution, den tidsperiod som omfattas och antalet datapunkter.

— Uppgifter som styrker att exponering av benmärgen inträffade.

— Karakteriseringsdata som visar om mikrokärnorna innehåller hela eller fragmenterade kromosomer, i förekommande fall.

— Kriterier som uppfyllts för positiv eller negativ respons.

▼M7

Diskussion av resultaten.

Slutsatser

Litteraturhänvisningar.

LITTERATURHÄNVISNINGAR

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

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

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

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

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

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

(8) Styles, J.A. m.fl. (2001), Automation of mouse micronucleus genotoxicity assay by laser scanning cytometry, Cytometry, vol. 44/2, s. 153–155.

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

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

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

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

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

▼M7

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

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

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

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

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

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

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

(21) Hayes, J. m.fl. (2009), The rat bone marrow micronucleus test–study design and statistical power, Mutagenesis, vol. 24/5, s. 419–424.

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

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

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

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

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

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

▼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. m.fl. (2013), Influence of counting methodology on erythrocyte ratios in the mouse micronucleus test, Environmental and Molecular Mutagenesis, vol. 54/3, s. 222–228.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

▼**M7**

(44) Richold, M. m.fl. (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. m.fl. (1989), ”Statistical Analysis of *in vivo* Cytogenetic Assays”, in Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Report, Part III, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 184–232.

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

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

▼M7

Tillägg 1

DEFINITIONER

Centromer: region(er) på en kromosom där kärnspolefibrer är fästa under celldelning, vilket möjliggör en ordnad rörelse av dotterkromosomerna mot dottercellernas poler.

Kemikalie: ett ämne eller en blandning.

Erytroblast: ett tidigt stadium i erytrocytens utveckling, omedelbart före det att den omogna erytrocyten bildas, där cellen fortfarande har en kärna.

Kinetokor: en proteinstruktur som bildas vid centromeren hos eukaryota celler vilken binder kromosomen till kärnspolens mikrotubuli under mitos och meios och som drar isär systerkromatiderna under celldelningen.

Mikrokärnor: små extra kärnor som är separata från cellernas huvudkärna, och som produceras under mitosens telofas (meios) från isolerade kromosomfragment eller hela kromosomer.

Normokromatisk eller mogen erytrocyt: fullt mogna erytrocyter som har förlorat det rest-RNA som kvarstår efter kärnbildningen och/eller har förlorat andra kortlivade cellmarkörer som vanligen försvinner efter kärnbildningen efter den slutliga delningen av erytroblasterna.

Polykromatisk eller omogen erytrocyt: nybildad erytrocyt i ett mellansteg i utvecklingen, som färgas med både de blå och röda komponenterna i klassisk blodinfärgning såsom Wrights Giemsa på grund av förekomsten av rest-RNA i den nybildade cellen. Sådana nybildade celler motsvarar ungefär retikulocyter, vilka visualiseras med hjälp av vitalfärgning som får rest-RNA att klumpas ihop till ett retikel. Nu för tiden används ofta andra metoder, bland annat monokromatisk färgning av RNA med fluorescerande färger eller märkning av kortlivade ytmarkörer som CD71 med fluorescerande antikroppar, för att identifiera nybildade röda blodceller. Polykromatiska erytrocyter, retikulocyter och CD71-positiva erytrocyter är alla omogna erytrocyter, men har en något annorlunda åldersfördelning.

Retikulocyt: nybildad erytrocyt som färgats med vitalfärgning som får rest-RNA i cellen att klumpa ihop sig till ett karakteristiskt retikel. Retikulocyter och polykromatiska erytrocyter har en liknande cellulär åldersfördelning.

Testkemikalie: alla ämnen eller blandningar som testas med denna testmetod.

▼M7

Tillägg 2

UTFORMNING AV FAKTORFÖRSÖK FÖR IDENTIFIERING AV SKILLNADER MELLAN KÖNEN I IN VIVO-TEST MED AVSEENDE PÅ MIKROKÄRNOR

Utformning och analys av faktorförsök

I denna utformning testas minst fem hanar och fem honor vid varje koncentrationsnivå, vilket innebär att minst 40 djur måste användas (20 hanar och 20 honor plus relevanta positiva kontroller).

Detta är ett av de enklaste faktorförsöken och det motsvarar en tvåvägs-variansanalys med kön och koncentrationsnivå som huvudsakliga effekter. Data kan analyseras med hjälp av många vanliga statistiska programvarupaket såsom SPSS, SAS, STATA, Genstat samt med hjälp av R.

Analysen delar upp variationen i datauppsättningen mellan kön, koncentrationer och interaktionen mellan kön och koncentrationer. Var och en av termerna testas mot en uppskattning av variationerna mellan replikatdjuren inom djurgrupper av samma kön som ges samma koncentration. Fullständig information om den underliggande metoden finns i många statistiska läroböcker (se litteraturhänvisningar) och i hjälpavsnitt i statistiska paket.

Nästa steg i analysen är att kontrollera interaktionstermen ”kön x koncentration” i ANOVA tabellen ([1]). I avsaknad av en signifikant interaktionsterm ger de kombinerade värdena mellan könen eller koncentrationsnivåerna giltiga statistiska test mellan nivåerna, baserat på den sammanslagna inomgruppsvariationen enligt ANOVA.

Nästa steg i analysen är att dela upp uppskattningen av variationen mellan koncentrationerna i kontraster, som möjliggör ett test avseende linjära och kvadratiska kontraster i responsen mellan koncentrationsnivåerna. Om en signifikant variation i kön x koncentration förekommer kan även denna term delas upp i interaktionskontraster enligt följande: linjära kontraster x kön och kvadratiska kontraster x kön. Med hjälp av dessa termer kan man testa om koncentrationsresponsen är parallell för de två könen eller om den skiljer sig åt.

Uppskattningen av den sammanslagna inomgruppsvariationen kan användas för parvisa test av skillnaderna mellan medelvärdena. Dessa jämförelser kan göras mellan medelvärdena för könen och medelvärdena för de olika koncentrationsnivåerna, t.ex. för jämförelser med de negativa kontrollnivåerna. Om det finns en signifikant interaktion kan man jämföra medelvärden för olika koncentrationer för samma kön eller medelvärden för båda könen vid samma koncentration.

Litteraturhänvisningar

Teori, utformning, metod, analys och tolkning av faktorförsök diskuteras i många statistiska läroböcker, från den enklaste tvåfaktorsanalysen till mer komplexa former som används i försöksutformningsmetoder (”Design of Experiment”). Följande förteckning är icke-uttömmande: Vissa böcker innehåller etablerade exempel på jämförbara utformningar, i vissa fall med koder för att köra analysen med hjälp av olika programvarupaket.

([1]) Statistiker som använder modelleringsmetoder som allmänna linjära modeller (GLM) kan använda analysen på ett annorlunda men jämförbart sätt. Det är inte nödvändigt att härleda den traditionella ANOVA-modellen, som bygger på algoritmiska metoder för statistisk beräkning som utvecklades före dataåldern.

▼M7

Box, G.E.P, Hunter, W.G. och 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. och 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. (1971). Statistical Principles in Experimental Design. McGraw Hill.

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

▼B

B.13/14 **MUTAGENICITET – TEST AV ÅTERMUTATION HOS BAKTERIER**

1. **METOD**

Denna metod är en kopia av OECD TG 471, Omvänt bakteriellt mutationstest (Bakterial Reserve Mutation Test (1997)).

1.1 INLEDNING

1 detta test av återmutation hos bakterier används aminosyraberoende stammar av *Salmonelle typhimurium* och *Escherichia coli* för att detektera punktmutationer, vilka innefattar substitution, addition eller deletion av ett eller några DNA-baspar (1) (2) (3). Testet bygger på principen att man detekterar mutationer som gör att redan existerande mutationer i teststammarna går tillbaka varvid den funktionella förmågan hos bakterierna att syntetisera en essentiell aminosyra återställs. De återmuterade bakterierna detekteras på grundval av sin förmåga att växa i frånvaro av den aminosyra som krävs hos den ursprungliga teststammen.

Punktmutationer är orsaken till många genetiska sjukdomar hos människor och mycket tyder på att punktmutationer i onkogener och suppressorgener för tumörer i somatiska celler är inblandade i bildning av tumörer hos människor och försöksdjur. Testet av återmutation hos bakterier är snabbt, billigt och relativt enkelt att utföra. Många av testarterna har ett flertal egenskaper som gör dem mera känsliga för detektion av mutationer inklusive responsiva DNA-sekvenser vid reversionssäten, ökad cellerpermeabilitet för stora molekyler och eliminering av reparationssystem för DNA eller förstärkning av felbenägna reparationsprocesser för DNA. Specificiteten hos teststammarna kan erbjuda en del nyttig information om de typer av mutationer som induceras av genotoxiska ämnen. En mycket stor databas med resultat för ett stort antal olika strukturer finns tillgänglig för tester av återmutation hos bakterier och väletablerade metoder har utvecklats för testning av kemikaler med olika fysisk-kemiska egenskaper, inklusive flyktiga ämnen.

Se även Allmän inledning, del B.

1.2 DEFINITIONER

ett test av *återmutation* hos antingen *Salmonella* typhimurium eller *Escherichia coli* detekterar mutation i en aminosyraberoende stam (histidin respektive tryptofan), vilket ger en stam som är oberoende av en extern tillförsel av aminosyror.

mutagener som ger basparsubstitutioner är ämnen som orsakar en basförändring i DNA. I ett test av återmutation kan denna förändring uppträda vid sätet för den ursprungliga mutationen eller på ett andra säte i det bakteriella genomet.

mutagener som ger förskjutningar (frameshift) är ämnen som orsakar addition eller deletion av ett eller flera baspar i DNA, vilket då ger en ändrad avläsningsordning i RNA.

▼B

1.3 INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN

Testet av återmutation hos bakterier utnyttjar prokaryota celler, vilka skiljer sig från däggdjursceller med avseende på sådana faktorer som upptag, metabolism, kromosomstruktur och processer för DNA-reparation. Tester som utförs in vitro kräver i allmänhet att det finns en yttre källa för metabolisk aktivering. Hos system för metabolisk aktivering in *vitro* kan inte förhållandena för däggdjur *in vivo* efterliknas helt och hållet. Testet ger därför ingen direkt information om den mutagena och den karcinogena potensen hos en substans i däggdjur.

Testet av återmutation hos bakterier används vanligen som en inledande undersökning av genotoxisk aktivitet och, i synnerhet, av aktivitet som inducerar punktmutationer. En omfattande databas har demonstrerat att många kemikalier som ger positiva resultat i detta test även uppvisar mutagen aktivitet i andra tester. Det finns exempel på mutagena ämnen som inte kan detekteras med hjälp av detta test. Skälen till dessa tillkortakommanden kan tillskrivas den specifika naturen hos den detekterade slutpunkten, skillnader i metabolisk aktivering, eller skillnader i biotillgänglighet. Å andra sidan kan faktorer som höjer känsligheten hos testet leda till en överskattning av den mutagena aktiviteten.

Testet av återmutation hos bakterier kan visa sig olämpligt för utvärdering av vissa klasser av kemikalier såsom starkt baktericida ämnen (t.ex. vissa antibiotika) och de som anses (eller är kända för att) interferera specifikt med systemet för cellreplikation hos däggdjur (t.ex. vissa inhibitorer av topoisomeras och vissa nukleosidanaloger). 1 sådana fall kan mutationstester på däggdjur vara mera lämpliga.

Även om många ämnen som ger positiva resultat i detta test är karcinogena för däggdjur, är korrelationen inte absolut. Den är beroende på kemisk klass och det finns karcinogener som inte kan detekteras med hjälp av detta test, eftersom de verkar genom andra, icke-genotoxiska mekanismer eller mekanismer som saknas i bakterieceller.

1.4 TESTMETODENS PRINCIP

Suspensioner med bakterieceller exponeras för testsubstansen i närvaro och i frånvaro av ett exogent system för metabolisk aktivering. 1 plattinkorporeringsmetoden blandas dessa suspensioner med en toppskiktsagar varpå plattor omedelbart görs på minimalmedium. I preinkubationsmetoden inkuberas behandlingsblandningen och sedan blandas denna med en toppskiktsagar innan plattor görs på minimalmedium. I båda metoderna räknas återmuterade kolonier efter två eller tre dagars inkubering och jämförs med antalet spontant återmuterade kolonier på kontrollplattor med lösningsmedel.

Ett flertal procedurer för att utföra testet av återmutation hos bakterier har beskrivits. Bland de som vanligtvis används ingår plattinkorporeringsmetoden (1) (2) (3) (4), preinkubationsmetoden (2) (3) (5) (6) (7) (8), fluktue-ringsmetoden (9) (10) och suspensionsmetoden (11). Modifikationer för testning av gaser eller ångor har tidigare beskrivits (12).

▼B

De procedurer som beskrivs i metoden hänför sig primärt till plattinkorporerings- och preinkubationsmetoder. Inga av dem är acceptabla för att genomföra experiment både med och utan metabolisk aktivering. Vissa substanser kan detekteras mer effektivt med hjälp av preinkubationsmetoden. Dessa substanser tillhör kemiska klasser som innefattar korta kedjor med alifatiska nitrosaminer, tvåvärda metaller, aldehyder, azofärger och diazoföreningar, pyrolizidinalkoloider, allylföreningar och nitroföreningar (3). Det är även känt att vissa klasser av mutanter inte alltid detekteras med hjälp av standardprocedurer såsom plattinkorporeringsmetoden eller preinkubationsmetoden. Dessa bör uppfattas som ”speciella fall” och det rekommenderas varmt att alternativa procedurer används för detektionen av dem. De följande ”speciella fallen” bör identifieras (tillsammans med exempel på procedurer som kan användas för detektionen av dem): azofärger och diazoföreningar (3) (5) (6) (13), gaser och flyktiga kemikaler (12) (14) (15) (16) samt glykosider (17) (18). En avvikelse från standardproceduren måste vara vetenskapligt motiverad.

1.5 BESKRIVNING AV TESTMETODEN

1.5.1 **Förberedelser**

1.5.1.1 *Bakterier*

Nya kulturer med bakterier bör få växa till sig fram till den sena exponentiella eller tidiga stationära tillväxtfasen (ungefär 10^9 celler per ml). Kulturer som befinner sig i sen stationär fas bör inte användas. Det är viktigt att de kulturer som används i experimentet har en hög tider med livsdugliga bakterier. Titern kan fås fram antingen ur tillväxtkurvor från historiska kontrolldata, eller ur varje försök genom att bestämma antalet livsdugliga celler med hjälp av ett utstrykningsexperiment.

Den rekommenderade inkubationstemparaturen är 37 °C.

Minst fem bakteriestammar bör användas. Dessa bör inkludera fyra av *S. typhimurium* (TA 1535; Ta 1537 eller TA97a eller TA97; TA9S; och TA100) som har visat sig vara tillförlitliga och ge en reproducerbar respons i olika laboratorier. Dessa fyra stammar av *S*, *typhimurium* har GC-baspar vid det primära återmutationsstället och det är känt att de inte kan detektera vissa oxiderande mutagener, tvärbindande ämnen och hydraziner. Sådana substanser kan detekteras med hjälp av E. *coli* WP2-stammar eller *S.* typhimurium TA 102 (19) som har ett AT-baspar vid det primära återmutationsstället. Den rekommenderade kombinationen av stammar är därför:

— S. *lyphimurium* TA 1535,

— *S. typhimurium* TA1537 eller TA97 eller TA97a,

— 5. *typhimuriurn* TA98,

— *S. typhimurium* TA100, och

— *E. coli* WP2 uvrA, eller C. *coli* WP2 uvrA (pKM101), eller S. *typhimurium* TA102.

Får att kunna detektera tvärbindande mutagener kan det vara lämpligt att inkludera TA102 eller att också använda en DNA-reparationsduglig stam av *E. coli* (t.ex. *E.coli* WP2 eller E. coli WP2 (pKM101)).

▼B

Etablerade procedurer för beredning av baskulturer, markörverifiering och lagring bör användas. Behovet av aminosyror för tillväxten bör påvisas för varje frusen preparation av baskulturer (histidin för stammar av *S. typhimurium* och tryptofan för stammar av *E. coli)*. Andra fenotypiska karakteristika bör kontrolleras på liknande sätt, nämligen närvaron eller frånvaron av R-faktorplasmider där detta är lämpligt (dvs. ampicillin-resi-stens i stammarna TA98, TA100 och TA97a eller TA97, WP2 uvrA och WP2 uvrA (pKM101) och ampicillin + tetracyklinreststens i stammen TA102); närvaron av karakteristiska mutationer (dvs. rfa-mutation i *S. typhimurium* genom känslighet för kristallviolett och uvrA-mutation i *E. coli* eller uvrB-mutation i *S. typhimurium* genom känslighet för ultraviolett ljus) (2) (3). Stammarna bör även ge spontant återmuterande platträkningar av kolonier inom de frekvensområden som kan förväntas från laboratoriets historiska kontrolldata och helst inom det område som rapporteras i litteraturen.

1.5.1.2 *Medium*

Använd en lämplig minimalagar (t.ex. innehållande Vogel-Bonner minimalmedium E och glukos) och ett agartoppskikt som innehåller histindin och biotin eller tryptofan, så att några stycken celldelningar ska kunna ske (1) (2) (9).

1.5.1.3 *Melabolisk aktivering*

Bakterier bör exponeras för testsubstansen både i närvaro och frånvaro av ett lämpligt system för metabolisk aktivering. Det vanligaste systemet som används är en post-mitokondriell fraktion där en kofaktor tillsatts (S9) vilken beretts ur lever från gnagare vilka behandlats med enzyminducerande ämnen såsom Aroclor 1254 (1) (2) eller en kombination av fenobarbiton och β-naftoflavon (18) (20) (21). Den post-mitokondriella fraktionen används vanligen vid koncentrationer i området från 5 till 30 % v/v i S9-blandningen. Valet av och betingelserna hos ett system för metabolisk aktivering kan bero på den klass av kemikalier som testas. I vissa fall kan det vara lämpligt att använda mer än en koncentration av den postmitokondriella fraktionen. För azofärger och diazoämnen, kan användning av ett reduktivt system för metabolisk aktivering vara lämpligare (6) (13).

1.5.1.4 *Beredning av testsubstansen*

Fasta testsubstanser bör lösas upp i eller blandas med lämpliga lösningsmedel eller vehiklar och spädas ut, om detta är lämpligt, före det att bakterierna behandlas. Flytande testsubstanser kan tillsättas direkt till testsystemen och/eller spädas ut före behandling. Nygjorda beredningar bör användas om inte stabilitetsdata visar att lagring kan accepteras.

Lösningsmedel/vehiklar bör inte kunna misstänkas för att reagera kemiskt med testsubstansen och bör vara förenliga med bakteriernas överlevnad samt S9-aktivitet (22). Om man använder andra lösningsmedel/vehiklar än gängse brukliga, bör användningen av dem ha stöd från data som visar på deras kompatibilitet. Därhelst det är möjligt, rekommenderas att man i första hand överväger vattenbaserade lösningsmedel/vehiklar.

▼B

1.5.2 **Försöksbetingelser**

1.5.2.1 *Teststammar (se 1.5.1.1)*

1.5.2.2 *Exponeringskoncentration*

Cytotoxiciteteri och lösligheten i den slutliga behandlingsblandningen är några av de kriterier som man måste ta hänsyn till vid bestämningen av den högsta mängd av testsubstansen som ska användas.

Det kan vara bra att bestämma toxicitet och löslighet i ett förberedande experiment. Cytotoxicitet kan detekteras genom en minskning av antalet återmuterande kolonier, en uttunning eller minskning av bakgrundstillväxten, eller graden av överlevnad hos de behandlade kulturerna. Cytotoxiciteten hos en substans kan ändras i närvaro av system för metabolisk aktivering. Olöslighet bör fastställas som en utfällning i den slutliga blandningen, under de verkliga försöksbetingelserna och ska vara synlig för blotta ögat.

Den maximala rekommenderade testkoncentrationen för lösliga icke-cytotoxiska substanser är 5 mg/platta eller 5 µl/platta. För icke-cytotoxiska substanser som inte är lösliga vid 5 mg/platta eller 5 µl/platta, bör en eller flera av de koncentrationer som testas vara olösliga i den slutliga behandlingsblandningen. Testsubstanser som är cytotoxiska redan under 5 mg/platta eller 5 µl/platta bör testas upp till en cytotoxisk koncentration. Fällningen torde inte störa bestämningen.

Minst fem olika analyserbara koncentrationer av testsubstansen bör användas, med ungefär halva log-intervall (dvs. √10) mellan testpunkterna för ett inledande experiment. Mindre intervall kan vara lämpliga när ett koncentrationssvar håller på att undersökas. Testning över en koncentration på 5 mg/platta eller 5 µl/platta kan övervägas vid utvärdering av substanser som innehåller avsevärda mängder av potentiellt mutagena föroreningar.

1.5.2.3 *Negativa och positiva kontroller*

Samtidiga stamspecifika positiva och negativa kontroller (lösningsmedel eller vehikel), både med och utan metabolisk aktivering, bör inkluderas i varje försök. Positiva kontrollkoncentrationer som visar på det effektiva utfallet för varje försök bör väljas.

För försök där ett system för metabolisk aktivering används, bör den positiva kontrollreferenssubstansen väljas på basis av de typer av bakteriestammar som används.

De följande substanserna utgör exempel på lämpliga positiva kontroller för försök med metabolisk aktivering:

Substans	CAS-nummer	EINECS-nummer
9,10-dimetylantracen	781-43-1	212-308-4
7,12-dimetylbensantracen	57-97-6	200-359-5
bens[a]pyren	50-32-8	200-028-5
2-aminoantracen	613-13-8	210-330-9

▼B

Substans	CAS-nummer	EINECS-nummer
Cyklofosfoamid	50-18-0	200-015-4
Cyklofosfoamidmonohydrat	6055-19-2	

Höljande substans är en lämplig positiv kontroll for den reduktiva metaboliska aktiveringsmetoden:

Substans	CAS-nummer	EINECS-nummer
kongorött	573-58-0	209-358-4

2-aminoantracen bör inte användas som den enda indikatorn på effektiviteten hos S9-blandningen. Om 2-aminoanracen används, bör varje sats av S9 även karakteriseras med en mutagen som kräver metabolisk aktivering med hjälp av mikrosomala enzymer, t.ex. bens[a]pyren, dimetylbensantracen.

Följande substanser utgör exempel på sortspecifika positiva kontroller för försök som utförs utan exogena system för metabolisk aktivering:

Substans	CAS-nummer	EINECS-nummer	Stam
Natriumazid	26628-22-8	247-852-1	TA 1535 och TA 100
2-nitrofluoren	607-57-8	210-138-5	TA 98
9-aminoakridin	90-45-9	201-995-6	TA 15 37, TA 97 och TA 97a
ICR 191	17070-45-0	241-129-4	TA 1537, TA 97 och TA 97a
Kumenhydroperoxid	80-15-9	201-254-7	TA 102
Mitomycin C	50-07-7	200-008-6	WP2uvrA och TA 102
N-etyl-N-nitro-N-nitrosoguanidin	70-25-7	200-730-1	WP2, WP2uvrA och WP2uvrA (pKM101)
4-nitroquinolin-1 -oxid	56-57-5	200-281-1	WP2, WP2uvrA och WP2uvrA (pKM101)
Furylfuramid (AF2)	3688-53-7		plasmidinnehållande stammar

Andra lämpliga positiva kontrollreferenssubstanser kan användas. Användningen av kemiska klassrelaterade positiva kontrollkemikalier bör övervägas när sådana finns att tillgå.

Negativa kontroller, bestående av enbart lösningsmedel eller vehikel, utan testsubstans, och i övrigt hanterade på samma sätt som för de behandlade grupperna, bör inkluderas. Obehandlade kontroller bör dessutom även användas, om det inte finns historiska kontrolldata som visar att inga farliga eller mutagena effekter induceras av det valda lösningsmedlet.

▼B

1.5.3 **Förfarande**

Vid plattinkorporeringsmetoden (1) (2) (3) (4), utan metabolisk aktivering, blandas vanligen 0,05 ml eller 0,1 ml av testlösningarna, 0,1 ml av färsk bakteriekultur (innehållande ungefär 10^8 livsdugliga celler) och 0,5 ml av steril buffert med 2,0 ml av toppskiktsagar. För ett försök med metabolisk aktivering blandas vanligen 0,5 ml av en metabolisk aktiveringsblandning, vilken innehåller en adekvat mängd postmitokondriell fraktion (i området från 5 till 30 % v/v i den metaboliska aktiveringsblandningen) med toppskiktsagar (2,0 ml), tillsammans med bakterierna och testsubstansen/testlösningen. Innehållet i varje rör blandas och hälls över ytan på en minimalagarplatta. Toppskiktsagarn tillåts att stelna innan inkubering sker.

För förinkubationsmetoden (2) (3) (5) (6), förinkuberas testsubstansen/testlösningen med teststamman (innehållande ungefär 10^8 livsdugliga celler) och steril buffert eller med system för metabolisk aktivering (0,5 ml), vanligen under 20 minuter eller längre vid 30–37 °C, innan den blandas med toppskiktsagarn och hälls uppå ytan på en minimalagarplatta. Vanligen blandas 0,05 eller 0,1 ml av testsubstansen/testlösningen, 0,1 ml bakterier och 0,5 ml av S9-blandningen eller steril buffert blandat med 2,0 ml av toppskiktsagar. Rören bör luftas under förinkubationen med hjälp av en skakmaskin.

För att möjliggöra en rimlig uppskattning av variationen bör tre plattor användas vid varje dosnivå. Användning av två plattor är acceptabelt när detta är vetenskapligt motiverat. Förlust av en enstaka platta innebär inte nödvändigtvis att ett försök blir ogiltigt.

Gasformiga eller flyktiga substanser bör testas med lämpliga metoder, såsom i slutna kärl (12) (14) (15) (16).

1.5.4 **Inkubering**

Alla plattor i en given assay bör inkuberas vid 37 °C under 48–72 timmar. Efter inkubationsperioden räknas antalet återmuterande kolonier per plattor.

2. **DATA**

2.1 BEHANDLING AV RESULTATEN

Data bör presenteras som antalet återmuterande kolonier per platta. Antalet återmuterande kolonier på såväl negativa (lösningsmedelskontroll och obehandlad kontroll, om en sådan används) och positiva kontrollplattor bör även anges. Individuella platträkningar, medelantalet för de återmuterande kolonierna per platta och standardavvikelsen bör uppges för såväl testsubstansen som för positiva och negativa (obehandlade och/eller (lösningsmedels) kontroller).

Der finns inget krav på verifiering av ett tydligt positivt svar. Tvetydiga resultat bör klarläggas genom fortsatta tester, lämpligen vid ändrade experimentella betingelser. Negativa resultat måste bekräftas från fall till fall. I de fall där det inte anses nödvändigt att bekräfta negativa resultat bör detta motiveras. Vid uppföljningsexperiment bör man överväga att ändra parametrarna i undersökningen för att utvidga de bedömda försöksbetingelserna. De försöksparametrar som skulle kunna modifieras innefattar koncentrationsindelningen, metoden för behandling (plattinkorporering eller förinkubation i vätska), och betingelser för metabolisk aktivering.

▼B

2.2 UTVÄRDERING OCH TOLKNING AV RESULTATEN

Det finns ett flertal kriterier som används för att bestämma om ett resultat är positivt, t.ex. en koncentrationsrelaterad ökning över hela det testade området och/eller en reproducerbar ökning, vid en eller flera koncentrationer, av antalet återmuterande kolonier per platta för minst en stam, med eller utan ett system för metabolisk aktivering (23). Man bör i första hand överväga resultatets biologiska relevans. Statistiska metoder kan användas som en hjälp vid utvärdering av testresultatet (24). Statistisk signifikans bör dock inte vara den enda faktor som bestämmer om svaret är positivt

En testsubstans för vilken resultatet inte uppfyller ovanstående kriterier anses vara icke-mutagen i detta test.

Även om de flesta experiment kommer att ge tydligt positiva eller negativa resultat, kan uppsättningen av data i sällsynta fall göra det omöjligt att utföra en otvetydig bedömning med avseende på testsubstansens aktivitet. Resultatet kan förbli tvetydigt eller tveksamt, oavsett hur många gånger experimentet upprepas.

Positiva resultat från testet av återmutation hos bakterier indikerar att substansen inducerar punktmutationer genom bassubstitutioner eller förskjutningar i genomet hos antingen *Salmonella typhimurium* och/eller *Escheri-chia coli.* Negativa resultat indikerar att testsubstansen inte är mutagen hos den testade sorten under dessa försöksbetingelser.

3. **RAPPORTERING**

TESTRAPPORT

Följande information måste ingå i testrapporten:

Lösningsmedel/vehikel:

— motivering för valet av lösningsmedel/vehikel

— testsubstansens löslighet och stabilitet i lösningsmedlet/vehikeln, om detta är känt,

Stammar:

— stammar som används

— antalet celler per kultur

— karakteristika för stammen

Försöksbetingelser:

— mängd av testsubstansen per platta (mg/platta eller µl/platta) med grund för val av dos och antal plattor per koncentration

— använda medier

— typ och sammansättning hos det system som används för metabolisk aktivering, inklusive acceptabilitetskriterier

— behandlingsprocedurer

Resultat:

— tecken på toxicitet

— tecken på utfällning

— individuella platträkningar

▼B

— medelantalet återmuterande kolonier per platta och standardavvikelse

— dos/respons-förhållande, där detta är möjligt

— statistiska analyser, om några sådana finns

— samtidiga negativa (lösningsmedel/vehikel) och positiva kontrolldata, med omfattning, medelvärden och standardavvikelser

— historiska negativa (lösningsmedel/vehikel) och positiva kontrolldata, med omfattning, medelvärden och standardavvikelser

Diskussion av resultaten.

Slutsatser.

4. **HÄNVISNINGAR**

1. Ames, B. N., McCann,). and Yamasaki E. (1975), Metods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/ Mammalian-Microsome Mutagenitic Test. *Mutation Res.,* 31, s. 347–364.

2. Maron, D. M. and Ames, B. N. (1983), Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. *MutationRes.* 113, s. 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, s. 217–23 3.

4. Kier, L. D., Brusick I., Auletta, A. E., Von Halle, E. S., Brown, M. M, Simmon, V. R, dunkel, V., McCann, J., Mortelmans, K., Prival, M., Rao, T.K. and Ray V. (1986), The *Salmonella* typhimurium/Mam malian Microsomal Assay: A Report of the U.S. Environmental Protection Agency GeneTox Program. *Mutation Res.* 168, s. 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, s. 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, s. 273–285.

7. Gatehouse, D. G., Rowland, 1. R., Wilcox. P., Callender, R. D. and Foster, R. (1980), Bacterial Mutation Assays, in: *Basic Mutagenicily Tests: UKEMS Part I Revised.* ed. D.). Kirkland, Cambridge University Press, s. 13–61.

8. Aeschacher, H. U., Wolleb. U. and Porchet, L. (1987), Liquid Preincubation Mutagenicity Test for Foods. *J. l:ood Safety,* 8, s. 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, *Mutation Res.,* 38, s. 33–42.

10. Hubbard, S. A., Green, M. H. L, Gatehouse, D. and Bridges,]. W. (1984), The Fluctuation Test in Bacteria, in: *Handbook of Mutagenicity Test Procedures,* 2nd Edition, cd. Kilbey, B. J., Legator, M., Nichols, W. and Ramel, C, Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, s. 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 lyphimuriurn, Environmental Mutagenesis.* 3, s. 453–465.

12. Araki, A., Noguchi, T., Kato, F. and Matsushima, T. (1994), Improved Method for Mutagenicity Testing of Gaseous Compounds by Using a Gas Sampling Bag, *Mutation Res.,* 307, s. 335–344.

13. Prival, M. J., Bell, S. J., Mitchell, V. D., Reipert, M. D. and Vaughan, V. L. (1984), Mutagenicity of Benzidine and Benzidine-Congener Dyes and Selected Monoazo Dyes in a Modified Salmonella Assay, *Mutation Res.,* 136, s. 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, s. 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, Ams terdam, s. 249–258.

16. Hughes, T.)., Simmons, D. M, Monteith, I. G. and Claxton, L. D. (1987), Vaporization Technique to Measure Mutagenic Activity of Volatile Organic Chemicals in the Ames/Salmonella Assay, *EnvironmenlalMutagenesis,* 9, s. 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 *Salmonella* typhimurium, *Cancer Res.,* 39, s. 3780–3782.

18. Tamura, G., Gold, C, Ferro-Luzzi, A. and Arnes, B. N. (1980), Fecalase: A Model for Activation of Dietary Glycosides to Mutagens by Intestinal Flora, *Proc. Natl. Acad. Sci,*. USA, 77, s. 4961–4965.

19. Wilcox, P., Naidoo, A., Wedd, D.). and Gatehouse, D. G. (1990), Comparison of *Salmonella* typhimurium TA 102 with *Escherichia coli* WP2 Tester strains, *Mutagenesis,* 5, s. 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. (. de Serres et al. Elsevier, North Holland, s. 85–88.

21. Elliot, B. M., Combes, R. D., Elcombe, C. R., Gatehouse, D. G., Gibson, G. G., Mackay, J. M. and Wolf, R. C. (1992), Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *in vitro* Genotoxicity Assays, Mutagenesis, 7, s. 175–177.

22. Maron, D., Katzenellenbogen, J. and Arnes, B. N. (1981), Compatibility of Organic Solvents with the Salmonella/Microsome Test, Mutation *Res.,* 88, s. 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, s. 83–91.

▼B

24. Mahon, G. A. T., Green, M. H. L, Middleton, B., Mitchel. I., Robinson, W. D. and Tweats, D. J. (1989), Analysis of Data from Microbial Colony Assays, in: *UKEMS Sub-Committee on Guidelines for MutagenicityTesting. Part* II. *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Dala,* ed. Kirkland, D.]., Cambridge University Press, s. 28–65.

▼M7

_____

_____

▼B

B.17 MUTAGENICITET – TEST AV GENMUTATIONER HOS DÄGGDJURSCELLER *IN VITRO*

1. METOD

Denna metod är en kopia av OECD TG 476, Test av genmutationer hos däggdjursceller in vitro (*In Vitro* Mammalian Cell Gene Mutation Test (1997)).

1.1 INLEDNING

Genmutationstestet *in vitro* för däggdjursceller kan användas för att detektera genmutationer som inducerats med hjälp av kemiska substanser. Lämpliga cellinjer innefattar L5178Y muslymfomceller, CHO-, CHO-AS52-och V79-linjerna från kinesiska hamsterceller och TK6 lymfoblastoidceller från människa (1). 1 dessa cellinjer mäter de vanligast använda genetiska slutpunkterna mutation av tymidinkinas (TK) och hypoxanthinguanin fosforibosyltransferas (HPRT), och en transgen av xanthin-guanin fosforibosyltransferas (XPRT). Mutationstesterna TK, HPRT och XPRT detekterar olika spektra av genetiska händelser. Den autosomala lokaliseringen av TK och XPRT kan göra det möjligt att detektera genetiska händelser (t.ex. stora deletioner) som inte detekteras vid HPRT-lokuset på X-kromosomer (2) (3) (4) (5) (6).

I genmutationstestet *in vitro* för däggdjursceller kan kulturer med etablerade cellinjer eller celltyper användas. De celler som används väljs ut på basis av tillväxtförmåga vid odling och stabilitet med avseende på spontan mutationsfrekvens.

Tester som utförs *in vitro* kräver i allmänhet att en exogen källa för metabolisk aktivering används. Detta system för metabolisk aktivering kan inte fullt ut efterlikna förhållandena in *vivo* hos däggdjur. Försiktighet bör iakttagas så att man undviker förhållanden som skulle kunna leda till resultat som inte avspeglar den verkliga mutageniciteten. Positiva resultat som inte avspeglar den verkliga mutageniciteten kan uppkomma från förändringar i pH, osmolalitet eller hög cytotoxicitet (7).

Detta test används för att undersöka möjliga mutagener och karcinogener i däggdjur. Många ämnen som är positiva i detta test är karcinogena i däggdjur. Det föreligger dock ingen perfekt korrelation mellan detta test och karcinogenicitet. Korrelationen är beroende på den kemiska klassen och det finns allt fler bevis för att det finns karcinogener som inte detekteras med hjälp av detta test, eftersom de verkar uppträda genom andra, icke-genotoxiska mekanismer eller mekanismer som är frånvarande i bakterieceller (6).

Se även Allmän inledning, del B.

1.2 DEFINITIONER

framåtmutation: en genmutation från den parentala typen till den mutanta formen, vilket ger upphov till en förändring eller en förlust av den enzymatiska aktiviteten i funktionen hos det protein som bildas.

mulagener som ger basparsubstitutioner: substanser som orsakar substitution av ett eller flera baspar i DNA.

förskjutnings (frameshift)-mutagene: substanser som orsakar addition eller deletion av ett eller flera baspar i DNA-molekylen.

▼B

fenotypisk expressionslid: en period under vilken celler som nyligen muterat töms på oförändrade genprodukter. *mutantfrekvens:* antalet mutanta celler som observerats, delat med antalet livskraftiga celler.

relativ total tillväxt: ökningen av antalet celler över tiden jämfört med en kontrollpopulation av celler, beräknat som produkten av suspensionstillväxten i förhållande till den negativa kontrollen, gånger kloningseffektiviteten i förhållande till den negativa kontrollen.

relativ suspensionstillväxt: ökning av cellantalet delat med expressionsperioden i relation till den negativa kontrollen.

viabilitel: kloningens effektivitet hos de behandlade cellerna vid tiden för utstryk på platta, under selektiva betingelser efter expressionsperioden.

överlevnad: kloningens effektivitet hos de behandlade cellerna när utstryk på platta sker vid behandlingsperiodens slut.

Överlevnaden uttrycks vanligen i förhållande till överlevnaden hos kontrollens cellpopulation.

1.3 TESTMETODENS PRINCIP

Celler som lider brist pä tymidinkinas (TK), beroende på mutationen $TK^{\pm}$ —> $TK^{+/-}$, är resistenta mot de cytotoxiska effekterna av pyrimidinanalogen trifluortymidin (TFT). Celler med väl fungerande tymidinkinas är känsliga för TFT, eftersom TFT ger upphov till inhibering av cellmetabolismen och stoppar fortsatt celldelning. Mutanta celler kan således utvecklas i närvaro av TFT, medan däremot normala celler, som innehåller tymidinkinas, inte klarar detta. Celler som lider brist på HPRT eller XPRT kan på liknande sätt väljas ut genom resistens mot 6-tioguanin (TG) eller 8-azaguanin (AG). Egenskaperna hos testsubstansen bör noggrant gås igenom om en basanalog eller ett ämne som är relaterat till det selektiva ämnet testas i något av testerna för genmutationer i däggdjursceller. Exempelvis bör varje misstänkt selektiv toxicitet hos testsubstansen mot mutanta och icke-mutanta celler undersökas. Det sätt som det selekterande systemet/ämnet fungerar på, måste således bekräftas när man testar kemikalier som är strukturellt relaterade med det selektiva ämnet (8).

Celler i suspension eller kulturer i form av ett enkelskikt exponeras för testsubstansen, både med och utan metabolisk aktivering, under en lämplig tidsperiod och subkultiveras för att bestämma cytotoxiciteten och för att tillåta fenotypisk expression innan mutantvalet sker (9) (10) (11) (12) (13). Cytotoxiciteten bestäms i vanliga fall genom att mäta den relativa kloningseffektiviteten (överlevnad) eller den relativa totala tillväxten för kulturerna efter behandlingsperioden. De behandlade kulturerna bibehålls i ett tillväxtmedium under en tillräckligt lång tid, karakteristisk för varje selekterat lokus och celltyp, för att tillåta i det närmaste optimal fenotypisk expression av inducerade mutationer. Mutationsfrekvensen bestäms genom att inockulera ett känt antal celler i ett medium som innehåller det selektiva ämnet för detektion av mutanta celler, och i ett medium utan selektivt ämne för bestämning av kloningseffektiviteten (viabiliteten). Efter en lämplig inkubationstid räknas cellerna. Mutationsfrekvensen erhålls från antalet mutanta kolonier i selektivt medium och antalet kolonier i icke-selektivt medium.

▼B

1.4 BESKRIVNING AV TESTMETODEN

1.4.1 **Förberedelser**

1.4.1.1 *Celler*

Det finns ett antal olika celltyper som kan användas i detta test, inklusive subkloner från L5178Y, CHO, CHO-AS52, V79 eller TK6-celler. De celltyper som används i detta test bör ha en demonstrerad känslighet mot kemiska mutagener, en hög kloningseffektivitet och en stabil spontan mutationsfrekvens. Cellerna bör kontrolleras med avseende på kontaminering från mykoplasma och bör inte användas om kontaminering skett.

Testet bör utformas på ett sådant sätt att det har en förutbestämd känslighet och styrka. Antalet celler, kulturer och koncentrationer av testsubstansen som används bör reflektera dessa definierade parametrar (14). Det minsta antalet livskraftiga celler som överlever behandlingen och används vid varje stadium av testet bör baseras på den spontana mutationsfrekvensen. En generell regel är att använda ett cellantal som är minst tio gånger det inverterade värdet av den spontana mutationsfrekvensen. Det rekommenderas dock att minst 10^6 celler används. Adekvata historiska data för det cellsystem som används bör vara tillgängliga för att kontrollera att testet ger reproducerbara resultat.

1.4.1.2 *Betingelser för media och kulturer*

Lämpliga kulturmedia och inkubationsbetingelser (odlingskärl, temperatur, CO_2-koncentration och luftfuktighet) bör användas. Mediet bör väljas ut i enighet med de selektiva system och celltyper som används i testet. Det är särskilt viktigt att betingelserna för kulturerna väljs på ett sådant sätt att man säkrar en optimal celltillväxt under expressionsperioden och en förmåga till bildning av kolonier för både mutanta och icke-mutanta celler.

1.4.1.3 *Förberedelse av kulturer*

Celler dras upp från stamkulturer, inokuleras i ett odlingsmedium och inkuberas vid 37 °C. Innan de används i detta test kan kulturerna behöva tvättas rena från redan existerande mutanta celler.

1.4.1.4 *Metabolisk aktivering*

Celler bör exponeras för testsubstansen både i närvaro och frånvaro av ett lämpligt system för metabolisk aktivering. Det system som vanligen används är en postmitokondriell fraktion som tillsatts en kofaktor (S9), beredd ur levern från gnagare vilka behandlats med enzyminducerande ämnen såsom Aroclor 1254 (15) (16) (17) (18) eller en kombination av fenobarbiton och β-naftoflavon (19) (20).

Den postmitokondriella fraktionen används vanligen vid koncentrationer i området 1–10 % v/v i det slutliga testmediet. Valet av och betingelserna för ett system för metabolisk aktivering kan vara beroende av klassen av kemikalier som testas. I vissa fall kan det vara lämpligt att använda mer än en koncentration av den postmitokondriella fraktionen.

▼B

Ett antal vidareutvecklingar, inklusive konstruktion av genetiskt modifierade cellinjer som uttrycker specifika aktiverande enzymer, kan ge en potential för endogen aktivering. Valet av de cellinjer som används bör vara vetenskapligt motiverat (t.ex. genom relevansen av cytokrom P450 isoenzym för metabolismen av testsubstansen).

1.4.1.5 *Beredning av testsubstansen*

Fasta testsubstanser bör lösas upp i eller blandas med lämpliga lösningsmedel eller vehiklar och spädas ut innan cellerna behandlas, om detta är lämpligt. Flytande testsubstanser kan tillsättas direkt till testsystemen och/eller spädas ut innan behandlingen startas. Nygjorda beredningar av testsubstansen bör användas om inte stabilitetsdata tyder på att lagring kan accepteras.

1.4.2 **Försöksbetingelser**

1.4.2.1 *Lösningsmedel/vehikel*

Lösningsmedlet/vehikeln bör inte kunna misstänkas för att reagera kemiskt med testsubstansen och bör vara förenlig med överlevnaden för cellerna samt S9-aktiviteten. Om andra lösningsmedel/vehiklar än gängse brukliga används bör det finnas data som visar att de är kompatibla. Det rekommenderas att vattenbaserade lösningsmedel/vehiklar i första hand bör övervägas närhelst det är möjligt. När substanser som är instabila i vatten testas, bör de organiska lösningsmedel som används vara fria från vatten. Vatten kan avlägsnas genom tillsats av en molekylsikt.

1.4.2.2 *Exponeringskoncentrationer*

Bland de kriterier som ska övervägas när den högsta koncentrationen ska fastställas är cytotoxicitet, löslighet i testsystemet och förändringar i pH eller osmolalitet.

Cytotoxicitet bör fastställas såväl med som utan metabolisk aktivering i huvudexperimentet med hjälp av lämplig indikation på cellernas integritet och tillväxt, såsom relativ kloningseffektivitet (överlevnad) eller relativ total tillväxt. Det kan vara lämpligt att fastställa cytotoxicitet och löslighet i ett förberedande experiment.

Minst fyra analyserbara koncentrationer bör användas. Där cytotoxicitet uppträder bör dessa koncentrationer täcka in ett område som sträcker sig från maximal toxicitet ner till liten eller ingen toxicitet. Detta innebär normalt att koncentrationsnivåerna bör separeras av minst en faktor mellan 2 och \10. Om den maximala koncentrationen är baserad på cytotoxicitet bör detta då resultera i ungefär 10–20 % (men inte mindre än 10 %) relativ överlevnad (relativ kloningseffektivitet) eller relativ total tillväxt. För relativt icke-cytotoxiska substanser, bör den maximala testkoncentrationen vara 5 mg/ml, 5 μl/ml eller 0,01 M, beroende på vilket som är det lägsta.

▼B

Relativt olösliga substanser bör testas upp till eller över sin löslighetsgräns under odlingsbetingelserna för kulturen. Bevis för olöslighet bör bestämmas i det slutliga behandlingsmediet för vilket cellerna exponeras. Det kan vara lämpligt att fastställa lösligheten vid behandlingens början och slutpunkt, eftersom lösligheten kan förändras under exponeringsförloppet i testsystemet beroende på närvaron av celler, S9, serum, etc. Olöslighet kan detekteras med hjälp av blotta ögat. Fällningen torde inte störa bestämningen.

1.4.2.3 *Kontroller*

Samtidiga positiva och negativa kontroller (lösningsmedel eller vehikel), både med och utan metabolisk aktivering, bör inkluderas i varje experiment. När metabolisk aktivering används, bör den positiva kontrollkemikalien vara av sådant slag att den kräver aktivering för att ge ett mutagent svar.

I tabellen nedan ges några exempel på positiva kontrollsubstanser.

Betingelser för metabolisk akti-vering	Lokus	Substans	CAS-nummer	EINECS-nummer
Frånvaro av exogen metabolisk aktivering	HPRT	Etylmetansulfonat	62-50-0	200-536-7
		Etylnitrosourea	759-73-9	212-072-2
	TK (små och stora kolonier)	Metylmetansulfonat	66-27-3	200-62 5-0
	XPRT	Etylmetansulfonat	62-50-0	200-536-7
		Etylnitrosourea	759-73-9	212-072-2
Närvaro av exogen metabolisk aktivering	HPRT	3-Metylkolantren	56-49-5	200-276-4
		N-Nitrosodimetylamin	62-75-9	200-549-8
		7,12-Dimetylbensantraccn	57-97-6	200-359-5
	TK (små och stora kolonier)	Cyklofosfoamid	50-18-0	200-015-4
		Cyklofosfoamidmonohydrat	6055-19-2	
		Bcns[a]pyrcn	50-32-8	200-028-5
		3-Metylkolantren	56-49-5	200-276-5
	XPRT	N-Nitrosodimetylamin (för höga nivåer av S-9)	62-75-9	200-549-8
		Bens[*a*]pyren	50-32-8	200-028-5

Andra lämpliga referenssubstanser för positiv kontroll kan användas, t.ex. om ett laboratorium har en historisk databas med 5-brom-2'-deoxiuridin [CAS-nummer 59-14-3, ElNECS-nummer 200-415-9] skulle även denna referenssubstans kunna användas. Användning av kemiska klassrelaterade positiva kontrollkemikalier bör övervägas när sådana finns att tillgå.

▼B

Negativa kontroller, bestående av enbart ett lösningsmedel eller en vehikel i behandlingsmediet och behandlade på samma sätt som behandlingsgrupperna bör inkluderas. Dessutom bör även obehandlade kontroller användas, om det inte finns historiska kontrolldata som visar att inga skadliga eller mutagena effekter induceras av det valda lösningsmedlet.

1.4.3 **Förfarande**

1.4.3.1 *Behandling med testsubstansen*

Prolifererande celler bör exponeras för testsubstansen både med och utan metabolisk aktivering. Exponering bör ske under en lämplig tidsperiod (normalt är 3–6 timmar effektivt). Exponeringstiden kan utsträckas över en eller flera cellcykler.

Antingen en eller två behandlade kulturer kan användas vid varje koncentration som testas. När enstaka kulturer används, bör antalet koncentrationer ökas så att ett adekvat antal kulturer säkerställs för analys (t.ex. minst åtta analyserbara koncentrationer). Två negativa (lösningsmedels-) kontrollkulturer bör användas.

Gasformiga eller flyktiga substanser bör testas med hjälp av lämpliga metoder, såsom slutna odlingskärl (21) (22).

1.4.3.2 *Mätning av överlevnad, viabilitet och mutantfrekvens*

Mot slutet av exponeringsperioden tvättas cellerna och odlas för att bestämma överlevnad och för att medge att den mutanta fenotypen uttrycks. Mätning av cytotoxicitet, genom en bestämning av den relativa kloningseffektiviteten (överlevnad) eller relativa totala tillväxten för kulturerna, initieras normalt efter behandlingsperioden.

Varje lokus har definierade krav på minimitid, så att närmast optimal fenotypisk expression av nyligen inducerade mutanter medges (HPRT och XPRT kräver minst 6–8 dagar och TK minst två dagar). Celler odlas ofta i ett medium med och utan selektiva ämnen för att såväl antalet mutanter som kloningens effektivitet ska kunna bestämmas. Mätningen av viabiliteten (används för att beräkna mutantfrekvensen) initieras vid slutet av expressionstiden genom utstryk på platta i ett icke-selektivt medium.

Om testsubstansen är positiv i testet L5178Y TK+/-, bör storleksmätning av kolonierna utföras på åtminstone en av testkulturerna (den högsta positiva koncentrationen) och på de negativa och positiva kontrollerna. Om testsubstansen är negativ i testet L5178Y TK+/-, bör storleksmätning av kolonierna utföras på de negativa och positiva kontrollerna. I undersökningar där TK6TK+/- används, kan storleksmätning av kolonierna utföras även där.

▼B

2. **DATA**

2.1 BEHANDLING AV RESULTATEN

Data bör inkludera en bestämning av cytotoxicitet och viabilitet, räkning av kolonier och mutantfrekvenser för de behandlade kulturerna och kontrollkulturerna. Om testet L5178Y TK+/- ger ett positivt svar, påvisas kolonier utifrån kriterier för små och stora kolonier för åtminstone en koncentration av testsubstansen (högsta positiva koncentrationen) och för de negativa och positiva kontrollerna. Den molekylära och cytogenetiska naturen hos både stora och små mutanta kolonier har undersökts mycket ingående (23) (24). I testet TK+/-påvisas kolonier utifrån kriterier för normal tillväxt (stora) och långsam tillväxt (små) av kolonier (25). Mutanta celler som har utsatts för den mest omfattande genetiska skadan uppvisar förlängda dubbleringstider och bildar därför små kolonier. Denna skada sträcker sig typiskt i en skala från förlust av hela genen till karyotypiskt synliga kromosomavvikelser. Induktion av mutanter som ger små kolonier har associerats med kemikalier som inducerar omfattande kromosomavvikelser (26). Mutanta celler som är mindre allvarligt påverkade växer med hastigheter liknande de som parentala celler uppvisar och bildar stora kolonier.

Överlevnad (relativa kloningseffektiviteter) eller relativ total tillväxt bör anges. Mutantfrekvensen bör uttryckas som antalet mutanta celler per antalet celler som överlever.

Individuella data för kulturerna bör anges. Alla data bör dessutom sammanfattas i tabellform.

Det finns inget krav på verifiering av ett tydligt positivt svar. Tvetydiga resultat bör klarläggas genom fortsatta tester, lämpligen vid ändrade experimentella betingelser. Negativa resultat måste bekräftas från fall till fall. I de fall där det inte anses nödvändigt att bekräfta ett negativt resultat bör detta motiveras. Vid tvetydiga eller negativa resultat bör man vid uppföljningsexperiment överväga att ändra parametrarna i undersökningen för att utvidga de bedömda försöksbetingelserna. Försöksparametrar som kan behöva modifieras inkluderar koncentrationsstegen och villkoren för metabolisk aktivering.

2.2 UTVÄRDERING OCH TOLKNING AV RESULTATET

Det finns ett flertal kriterier som används för att bestämma om ett resultat är positivt, t.ex. en koncentrationsrelaterad ökning eller en reproducerbar ökning i mutationsfrekvensen. Man bör i första hand överväga resultatets biologiska relevans. Statistiska metoder kan vara till hjälp vid utvärdering av testresultatet. Statistisk signifikans bör dock inte vara den enda faktor som bestämmer om resultatet är positivt.

En testsubstans för vilken resultatet inte uppfyller ovanstående kriterier anses vara icke-mutagen i detta test.

▼B

Även om de flesta experiment kommer att ge tydligt positiva eller negativa resultat, kan i sällsynta fall uppsättningen av data göra det omöjligt att utföra en otvetydig bedömning med avseende på testsubstansens aktivitet. Resultatet kan förbli tvetydigt eller tveksamt, oavsett hur många gånger som experimentet upprepas.

Positiva resultat från testet av genmutationen *in vitro* hos däggdjursceller indikerar att testsubstansen inducerar genmutationer i de odlade däggdjursceller som används. Ett positivt koncentrationssvar som är reproducerbart är mycket meningsfullt. Negativa resultat indikerar att testsubstansen, under försöksbetingelserna, inte inducerar genmutationer i de odlade däggdjursceller som används.

3. **RAPPORTERING**

TESTRAPPORT

Följande information måste ingå i testrapporten:

Lösningsmedel/vehikel:

— motivering för valet av vehikel/lösningsmedel

— testsubstansens stabilitet och löslighet i lösningsmedlet/vehikeln, om detta är känt

Celler:

— cellernas typ och källa

— antalet cellkulturer

— antalet cellpassager, om detta är tillämpligt

— metoder för bibehållande av cellkulturen, om detta är tillämpligt

— frånvaro av mykoplasma

Försöksbetingelser:

— grund för val av koncentrationer och antalet kulturer inklusive t.ex. data för cytotoxicitet och löslighetsbegränsningar, om dessa finns att tillgå

— mediernas sammansättning, CO_2-koncentration

— testsubstansens koncentration

— den tillsatta vehikelns och testsubstansens volym

— inkubationstemperatur

— inkubationstid

— behandlingens varaktighet

— celldensitet under behandlingen

— typ och sammansättning hos det system som används för metabolisk aktivering, inklusive acceptabilitetskriterier

— positiva och negativa kontroller

▼B

— expressionsperiodens varaktighet (inklusive antalet celler som inokulerats, samt subkulturer och scheman för näringstillförsel, om detta är tillämpligt)

— selektiva ämnen

— kriterier för när tester ska anses som positiva, negativa eller tvetydiga

— metoder som används för att räkna antalet livskraftiga och muterade celler

— definition av kolonier vars storlek och typ ska beaktas (inklusive kriterier för ”små” och ”stora” kolonier, där detta är tillämpligt)

Resultat:

— tecken på toxicitet

— tecken pä utfällning

— data för pH och osmolalitet under det att exponering för testsubstansen sker, om sådana data har upp mätts

— koloniernas storlek (i de fall de räknats) för åtminstone negativa och positiva kontroller

— laboratoriets möjligheter att detektera mutanter som ger små kolonier med L5178Y TK+/–systemet, där detta är tillämpligt

— dos/respons-förhållande, där detta är möjligt

— statistiska analyser, om sådana finns

— samtidiga negativa (lösningsmedel/vehikel) och positiva kontrolldata

— historiska negativa (lösningsmedel/vehikel) och positiva kontrolldata med intervall, medelvärden och stan dardavvikelser

— mutationsfrekvens

Diskussion av resultaten.

Slutsatser.

4. **HÄNVISNINGAR**

1. Moore, M. M., DeMarini, D. M. DeSerres, F. J. and Tindal, K. R. (eds.) (1987), *Banbury* Report *28; Mam-malian Cell Mutagenesis,* Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

2. Chu, E. H. Y. and 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, s. 1306–1312.

3. Liber, H. L. and Thilly, W. G. (1982), Mutation Assay at the Thymidine Kinase Locus in Diploid Human Lymphoblasts, *Mutation Res.,* 94, s. 467–485.

4. Moore, M. M.. Harington-Brock, K., Doerr, C. L. and Dearfield, K. L. (1989), Differential Mutant Quanti tation at the Mouse Lymphoma TK and CHO HGPRT Loci. *Mutagenesis,* s. 394–403.

▼B

5. Aaron, C. S., and Stankowski, Jr. L. F., (1989), Comparison of the AS52/XPRT and the CHO/HPRT Assays: Evaluation of the Six Drug Candidates, *Mutation Res.,* 223, s. 121–128.

6. Aaron, C. S., Bolcsfoldi, G., Glatt, H. R., Moore, M., Nishi, Y., Stankowski, Jr. L. F., Theiss, J. and 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, s. 235–239.

7. Scott, D., Galloway, S. M., Marshall, R. R., Ishidate, M., Brusick, D., Ashby, J. and Myhr, B. C. (1991) Genotoxicity Under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9, Mutation Res., 25 7. s. 147–204.

8. Clive, D., McCuen, R., Spector, J. F. S., Piper, C. and Mavournin, K. H. (1983), Specific Gene Mutations in L5178Y Cells in Culture. A Report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. Mutation Res., 115, s. 225–251.

9. Li, A. P., Gupta, R. S., Heflich, R. H. and 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 Protections Agency Gene-Tox Program, Mutation Res,, 196, s. 17–36.

10. 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. and 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, s. 135–141.

11. Liber, H. L, Yandell, D. W. and 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, s. 9–17.

12. Stankowski, L. F. Jr., Tindal,, K. R., and Hsie, A. W. (1986), Quantitative and Molecular Analyses of Ethyl Methanosulphonate and ICR 191-Induced Molecular Analyses of Ethyl Methanosulphonate and 1CR 191 Induced Mutation in AS52 Cells, *Mutation Res*.. 160, s. 133–147.

13. Turner, N. T., Balton, A. G. and Clive, D. (1984), Procedure for the L51 78Y/$TK^{+/-}$ – $TK^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cell Mutagenicity Assay, in: Kilbey, B.J. et all (eds.) *Handbook oj Mutagenicity Test Procedures,* Else-vier Science Publishers, New York, s. 239–268.

14. Arlett, C. F.. Smith, D. M., Clarke, G. M., Green, M. H. L., Cole, J., McGregor, D. B. and Asquith S. C. (1989), Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation, in: *Statistical Evaluationof Mutagenicity Test Data,* Kirkland, D. J., ed., Cambirdge University Press, s. 66–101.

15. Abbondandolo, A., Bonatti, S., Corti, G., Fiorio, R., Loprieno, N. and Mazzaccaro, A. (1977), Induction of 6-Thioguanine-Resistant Mutants in V79 Chinese Hamster Cells by Mouse-Liver Microsome- Activated Dimethyllnitrosamine, *Mutation Res.,* 46, s. 365–373.

16. 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, s. 347–364.

▼B

17. Clive, D., Johnson, K. O., Spector, J. F. S., Batson A. G. and Brown M. M. M. (1979), Validation and Characterization of the L5178Y/TK+/- – Mouse Lymphoma Mutagen Assay System. *Mutat. Res.,* 59, s. 61–108.

18. Maron, D. M. and Arnes, B. N. (1983), Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, *MutuationRes*.. 113, s. 173–215.

19. Elliott, E. M., Combes, R. D., Elcombe, C. R., Gatehouse, D. G., Gibson, G. G., Mackay, J. M. and Wolf, R. C. (1992), Alternatives to Aroclor 1254-Induced S9 in: *In Vitro* Genotoxicity Assays, *Mutagenesis* 7, s. 175–177.

20. Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976), A Safe Substitute for Polycholrinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems, in:In *Vitro Metabolic Activation in MutagenesisTesting,* de Serres, F. J., Fouts, J. R., Bend, J. R. and Philpot, R. M. (eds), Elsevier, North-Holland, s. 85–88.

21. Krahn, D. F., Barsky, F. C. and 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 AirborneAgents,* New York, Plenum, s. 91–103.

22. Zamora, P. O., Benson, J. M., Li, A. P. and Brooks, A. L. (1983), Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Gollagen Gels tor Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay, *Environmental Mutagenesis,* 5, s. 795–801.

23. Applegate, M. L., Moore, M. M., Broder, C. B., Burrell, A. and Hozier. J. C. (1990), Molecular Dissection of Mutations at the Heterozygous Thymidine Kinase Locus in Mouse Lymphoma Cells, *Proc. Natl. Acad.Sci. USA,* 87, s. 51–55.

24. Moore, M. M., Clive, D. Hozier, J. C, Howard, B. E., Batson, A. G., Turner, N. T. and Sawyer, J. (1985), Analysis of Trifluoronthymidine, Resistant (TFT) Mutants of L5178Y/TK+/- – Mouse Lymphoma Cells, *Mutation Res.*, 151, s. 161–174.

25. Yandell, D. W., Dryja, T. P. and Little, J. B. (1990), Molecular Genetic Analysis of Recessive Mutations at a Heterozygous Autosomal Locus in Human Cells, *Mutation Res.,* 229, s. 89–102.

26. Moore, M. M. and Doerr, C. L. (1990), Comparison of Chromosome Aberration Frequency and Small Colony TK-Deficient Mutant Frequency in L5178Y/TK+/- – 3.7.2C Mouse Lymphoma Cells, *Mutagenesis,* 5, s. 609–614.

▼M7

_____

_____

_____

▼B

B.21 **CELLTRANSFORMATIONSTEST PÅ DÄGGDJURSCELLER *IN VITRO***

1. **METOD**

1.1 INLEDNING

Se allmän inledning till del B.

1.2 DEFINITION

Se allmän inledning till del B.

1.3 REFERENSÄMNEN

Inga.

1.4 TESTMETODSPRINCIP

Kulturer av däggdjursceller kan användas för upptäckt av fenotypiska förändringar *in vitro* som inducerats av kemiska förbindelser i samband med maligna transformationer *in vivo*. De mest använda celltyperna är C3H10TlVi, 3T3, SHE, Fischer-råtta, och testerna bygger på förändringar i cellmorfologin, fokusbildning eller egenskapen att kunna växa i mjuk agar. Det finns också mindre vanligt använda stammar som används för undersökning av andra fysiologiska eller morfologiska förändringar i celler till följd av exponering för cancerogena kemiska förbindelser. Inga direkta verkningsmekanismförbindelser mellan cancer och de genetiska endpoints som används i dessa tester *in vitro* finns beskrivna. Några av testsystemen kan användas för upptäckt av tumörpromotorer. Den cytotoxiska effekten kan bestämmas genom mätning av testämnets verkan på kolonibildande (kloniseringseffektiviteten) eller kulturernas växtfrekvens. Syftet med mätningen av den cytotoxiska effekten är att konstatera om exponering för testämnet är toxikologiskt relevant, men kan inte användas för beräkning av transformationsfrekvensen i alla tester, eftersom vissa kräver lång inkubationstid och/eller överföring till nya plattor.

1.5 KVALITETSKRITERIER

Inga.

1.6 METODBESKRIVNING

Förberedelser

C e l l e r

En rad olika cellinjer eller primärlinjer kan användas beroende på vilken transformationstest som görs. Försöksledaren måste säkerställa att använda celler genomgår relevanta fenotypiska förändringar efter exponering för kända cancerogener, och försöksledarens eget laboratorium måste ha bevisat och dokumenterat det använda testets validitet och trovärdighet.

M e d i u m

Medium och försöksbetingelser som är lämpliga för transformationstest ska användas.

▼B

Testämne

Testämnet tillsätts i ett kulturmedium eller upplöses eller suspenderas i lämpliga vehiklar innan cellerna exponeras. Koncentrationen av vehikeln bör inte orsaka någon ändring av cellers livskraft eller växtegenskaper.

Metabolisk aktivering

Cellerna exponeras för testämnet både i närvaro och i frånvaro av ett lämpligt exogent metaboliskt aktiveringssystem. Om celltyper med endogen metabolisk aktivering används bör det vara bevisat att aktiveringsform och -hastighet är lämpligt för den kemiska klass som testas.

Testbetingelser

Användning a v negativa och positiva kontroller

Som positiva kontroll används vid varje enskilt försök både en direkt verkande kemisk förbindelse och en förbindelse som kräver metabolisk aktivering. Dessutom företas negativ (vehikel) kontroll.

Följande kemiska förbindelser kan t.ex. användas till positiv kontroll:

— direktverkande förbindelser:

  — etylmetansulfonat,

  — H-propiolacton,

— förbindelser som kräver metabolisk aktivering:

  — 2 -acetylaminofluoren,

  — 4-dimetylaminoazobenzen,

  — 7,12-dimetylbenzanthracen.

Vid behov kan en supplerande positiv kontroll göras med användning av en kemisk förbindelse av samma typ som testämnet.

Exponeringskoncentration

Flera koncentrationer av testämnet ska användas. Dessa koncentrationer bör framkalla en koncentrationsrelaterad toxisk verkan. Den högsta koncentrationen bör medföra en låg överlevnadsgrad och överlevnadsgraden vid den lägsta koncentrationen bör vara av samma storlek som vid det negativa kontrollförsöket. Ämnen som är relativt oupplösliga i vatten testas på lämpligt sätt upp till gränsen för löslighet. Den högsta koncentrationen av icke-toxiska testämnen, som är fritt lösliga i vatten, fastställs från test till test.

▼B

Testförfarande

Cellerna bör exponeras under för det använda testsystemet passande period. Detta kan inbegripa upprepad dosering åtföljt av en ändring av medium (och vid behov ny metabolisk aktivering) om det är fråga om långvarig exponering. Celler vars endogena metaboliska aktivering är otillräcklig testas både med och utan ett lämpligt metaboliskt aktiveringssystem. Efter exponeringen tvättas cellerna fria från testämne. Därefter odlas de i syfte att låta den transformerade fenotyp som testet bygger på komma till uttryck och i syfte att bestämma transformationsfrekvensen. Alla resultat ska bekräftas genom ett oberoende test.

2. **DATA**

Data ska ställs upp i tabellform och kan ta sig olika uttryck beroende på använt testsystem. Det kan t.ex. röra sig om räkning av plattor, positiva plattor eller antal transformerade celler. Vid behov anges överlevnadsgraden som en procentdel av överlevnaden i kontrollförsöken, och transformationsfrekvensen uttrycks som antal transformerade celler per överlevande. Utvärderingen av data grundas på lämpliga statistiska metoder.

3. **RAPPORTERING**

3.1 TESTRAPPORT

Testrapporten ska om möjligt innehålla minst följande uppgifter:

— Använd celltyp, antal cellkulturer, metoder för bibehållande av cellkulturer.

— Testbetingelser: Testämnekoncentration, använd vehikel, inkubationstid, testets varaktighet och frekvens, celltäthet under exponeringen, använt exogent metaboliskt aktiveringssystem, positiva och negativa kontroller, specifikation av den fenotyp som testet bygger på, använt selektivt system (om sådant har använts), motivering för val av doser.

— Metoder för registrering av livskraftiga och transformerade celler.

— Statistisk utvärdering.

— Diskussion om resultaten.

— Tolkning av resultaten.

3.2 UTVÄRDERING OCH TOLKNING

Se allmän inledning till del B.

4. **HÄNVISNINGAR**

Se allmän inledning till del B.

▼B

B.22 DOMINANT LETAL TEST PÅ GNAGARE

1. METOD

1.1 INLEDNING

Se allmän inledning till del B.

1.2 DEFINITIONER

Se allmän inledning till del B.

1.3 REFERENSÄMNEN

Inga.

1.4 TESTMETODSPRINCIP

Dominanta letala verkningar leder till att embryot eller fostret dör. När dominanta letala mutationer framkallas genom exponering för en kemisk ämne är det ett tecken på att försöksdjurartens könscellvävnader har skadats. Det råder bred enighet om att dominanta letala gener uppstår till följd av kromosomskador (strukturella och numeriska anomalier). Om exponerade handjurs avkomma dör på det embryonala stadiet kan även detta skyllas på toxiska verkningar.

Normalt exponeras handjur för testämnet och paras med jungfruliga hondjur. Könscellernas olika stadier kan undersökas separat genom att använda på varandra följande parningsperioder. Ökningen av antalet döda implantater per hondjur i den exponerade gruppen i förhållande till antalet döda implantater per hondjur i kontrollgruppen visar den letala verkan efter implantation. Det letala verkan före implantation kan bedömas på grundlag av räkning av corpora lutea eller genom sammanslagning av det totala antalet implantater per hondjur i de exponerade grupperna och kontrollgruppen. Den totala dominanta letala verkan är summan av de letala verkningar före och efter implantation. Beräkningen av den totala dominanta letala verkan grundas på sammanräkning av antalet levande implantater per hondjur i försöksgruppen och antalet levande implantater per hondjur i kontrollgruppen. En minskning av antalet implantater under bestämda tidsperioder kan skyllas på celldöd (av spermacyter och/eller spermatogoner).

1.5 KVALITETSKRITERIER

Inga.

1.6 METODBESKRIVNING

Förberedelser

Testämnet upplöses eller suspenderas i fysiologisk saltlösning. Kemiska förbindelser som inte är lösliga i saltlösning ska lösas eller suspenderas i lämplig vehikel. Den vehikel som används får inte inverka på testämnet eller framkalla toxiska effekter. Nyligen framställda lösningar av testämnet ska användas.

▼B

Försöksbetingelser

Tillförselväg

Testämnet ska vanligen endast tillföras en gång. På grundval av toxikologisk information kan upprepad behandling användas. Vanligtvis tillförs testämnet genom oral intubering eller intraperitoneal injicering. Även andra tillförselvägar kan användas

Försöksdjur

Råttor och möss rekommenderas som försöksdjur. Friska könsmogna djur fördelas slumpmässigt i behandlings- och kontrollgrupper.

Antal och kön

Ett lämpligt antal handjur bör användas, med hänsyn tagen till den spontana variationen i den biologiska egenskap som utvärderas. Beslutet om hur många djur som ska användas bör grundas på den på förhand fastställda känsligheten för upptäckt och betydelsegrad. Vid ett typiskt försök ska det finnas tillräckligt med handjur för att uppnå 30–50 dräktiga hondjur varje parningsperiod.

Användning a v negativa och positiva kontroller

Normalt görs sidlöpande positiva och negativa (vehikel) kontroller för varje försök. Om det finns godtagbara positiva kontrollresultat från nyligen genomförda försök i samma laboratorium kan dock dessa användas i stället för sidlöpande positiv kontroll. Positiva kontrollämnen används i tillräcklig låga doser (t.ex. MMS i. p., 10 mg/kg) för att visa testens känslighet.

Dosnivåer

Normalt används tre olika dosnivåer. Den högsta dosnivån bör orsaka tecken på toxiska verkningar eller minskad fertilitet hos de exponerade djuren. I vissa fall räcker det med en enda hög dosnivå.

Gränstest

Icke-toxiska ämnen testas vid 5 g/kg i en enda dos eller vid upprepad tillförsel av 1 g/kg/dag.

Förfarande

Flera olika doseringsscheman kan användas. Normalt ges hela dosen på en gång men andra behandlingsscheman kan också användas.

Efter behandling paras handjuren med lämpliga intervaller individuellt med 1–2 jungfruliga hondjur. Hondjuren placeras hos handjuren under en period som motsvarar minst en äggcykel, eller tills parning har skett, vilket konstateras genom närvaron av sperma i vaginan eller närvaron av en vaginalpropp.

▼B

Antal parningar efter behandlingen fastställs på grundval av doseringsschemat och bör säkerställa att alla könscellsstadier är representerade efter doseringen.

Hondjuren avlivas under den andra hälften av dräktigheten och innehållet i livmodern undersöks för bestämning av antalet levande och döda implantat. Äggstockarna undersöks för bestämning av antalet corpora lutea.

2. **DATA**

Data ska ställas upp i tabellform och ange antal handjur samt antal dräktiga och icke dräktiga hondjur. Resultaten av varje enskild parning, inbegripet identifiering av varje han- och hondjur, ska anges separat. För varje hondjur anges parningsvecka, handjurets dos och antalet levande och döda implantat.

Beräkningen av den totala dominanta letala verkan grundas på jämförelse av antal levande implantat per hondjur hondjur i försöksgruppen och antalet levande implantat per hondjur i kontrollgruppen. Förhållandet mellan döda och levande implantat i försöksgruppen i jämförelse med förhållandet i kontrollgruppen analyseras för bestämning av den letala verkan efter implantation.

Om data registreras som tidiga eller sena dödsfall ska detta framgå av tabellerna. Om en utvärdering av den letala verkan sker före implantation ska denna anges. Den letala verkan före implantation kan beräknas som skillnaden mellan antalet *corpora lutea* och antalet implantater eller som en minskning av det genomsnittliga antalet implantat per livmoder i jämförelse med kontrollparningarna.

Utvärderingen av resultat ska grundas på en lämplig statistisk metod.

3. **RAPPORTERING**

3.1 TESTRAPPORT

Testrapporten ska om möjligt innehålla minst följande uppgifter:

— Djurart, stam, de använda djurens ålder och vikt, antal djur av varje kön i försöks- och kontrollgrupperna.

— Testämne, vehikel, testade dosnivåer och motivering för val av doser, negativa och positiva kontroller.

— Tillförselväg och dosens varaktighet.

— Parningsschema.

— Metod för bestämning av om parning skett.

— Tidpunkt för avlivning.

— Kriterier för registrering av dominanta letala gener.

— Förhållandet mellan dos och reaktion när detta är möjligt.

▼B

— Statistisk utvärdering.

— Diskussion om resultaten.

— Tolkning av resultaten.

3.2 UTVÄRDERING OCH TOLKNING

Se allmän inledning till del B.

4. **HÄNVISNINGAR**

Se allmän inledning till del B.

▼B

B.23 SPERMATOGONIAL TEST AV KROMOSOMAVVIKELSER HOS DÄGGDJUR

1. METOD

Denna metod är en kopia av testet OECD TG 483, Spermatogonial test av kromosomavvikelser hos däggdjur (Mammalian Spermatogonial Chromosomc Aberration Test (1997)).

1.1 INLEDNING

Ändamålet med testet av spermatogoniala avvikelser *in vivo* hos däggdjur, är att identifiera de substanser som orsakar strukturella kromosomavvikelser i spermatogoniala celler hos däggdjur (1) (2) (3) (4) (5). Strukturella avvikelser kan vara av två typer, kromosomala eller kromatida. Majoriteten av de kemiska mutagenerna inducerar avvikelser av kromatidtyp, men även avvikelser av kromosomtyp förekommer. Denna metod är inte utformad för att mäta numeriska avvikelser och används inte rutinmässigt för detta ändamål. Kromosommutationer och relaterade händelser är orsaken till många genetiska sjukdomar hos människor.

Detta test mäter kromosomhändelser i spermatogoniala könsceller och förväntas därför utgöra en förutsägelse på induktion av ärftliga mutationer i könsceller.

Gnagare används rutinmässigt i detta test. Detta cytogenetiska test *in vivo* detekterar kromosomavvikelser i spermatogoniala mitoser. Andra målceller omfattas inte av denna metod.

För att detektera avvikelser av kromatidtyp i spermatogoniala celler, bör den första mitotiska celldelningen efter behandlingen undersökas innan dessa skador förloras i de påföljande celldelningarna. Ytterligare information från behandlade spermatogoniala stamceller kan erhållas genom meiotisk kromosomanalys av avvikelser av kromosomtyp vid diakinesmetafas I, när de behandlade cellerna förvandlas till spermatocyter.

Detta *in vivo*-test är utformat för att undersöka om mutagener för somatiska celler även är aktiva i könsceller. Det spermatogoniala testet är dessutom relevant för att fastställa risken för mutagenicitet, eftersom det medger att faktorer för *in vivo* metabolism, farmakokinetik och reparationsprocesser för DNA beaktas.

Ett antal generationer av spermatogonier finns närvarande i testikeln med ett spektrum av känslighet för kemisk behandling. De avvikelser som detekteras representerar alltså ett samlat svar på behandlade spermatogoniala cellpopulationer, där de mera talrika differentierade spermatogoniala cellerna överväger. Olika generationer av spermatogonier kan där komma i kontakt med det stora kretsloppet. Om detta sker eller ej avgörs av deras position inne i testikeln, beroende på den fysiska och fysiologiska Sertoli-cellbarriären och på blod/testikelbarriären.

Om det finns bevis för att testsubstansen, eller en reaktiv metabolit, inte kommer att nå fram till målvävnaden, är det inte lämpligt att använda detta test.

Se även Allmän inledning, del B.

▼B

1.2 DEFINITIONER

avvikelse av kromatidtyp: strukturell kromosomskada uttryckt som brott på enstaka kromatider eller brott och återförening mellan kromatider.

avvikelse av kromosomtyp: strukturell kromosomskada uttryckt som brott och återförening, på båda kromatiderna på samma ställe.

lucka: en akromatisk skada som är mindre än bredden på en kromatid, och med ett minimum av misspassning hos kromatiderna.

numerisk avvikelse: en förändring av antalet kromosomer från det normala antalet karakteristiskt för det försöksdjur som används.

polyploidi: en multipel av det haploida kromosomantalet (n) som skiljer sig från det diploida (dvs. 3n, 4n osv.).

strukturell avvikelse: en förändring av kromosomstrukturen som är detekterbar med hjälp av en mikroskopisk undersökning av metafasstadiet vid celldelning, observerad i form av deletioner, interna eller externa utbyten.

1.3 TESTMETODENS PRINCIP

Försöksdjur exponeras för testsubstansen genom ett lämpligt exponeringssätt och avlivas sedan vid en lämplig tid efter behandling. Innan avlivningen sker, behandlas försöksdjuren med en substans som gör att celldelningen stannar upp i metafas (t.ex. colchicin eller Colcemid®). Kromosomberedninger görs sedan från könsceller och färgas in, varpå de celler som är i metafas analyseras med avseende på kromosomavvikelser.

1.4 BESKRIVNING AV TESTMETODEN

1.4.1 **Förberedelser**

1.4.1.1 *Val av djurarter*

Handjur av kinesiska hamstrar och möss används i stor utsträckning. Det är även möjligt att använda hanar från andra lämpliga däggdjursarter. Man bör välja de stammar av unga, friska vuxna djur som vanligen används på laboratorier. När undersökningen ska påbörjas är det lämpligt att viktskillnaden mellan djuren är så liten som möjligt och den bör inte överstiga ± 20 % av medelvikten.

1.4.1.2 *Förhållanden vid förvaring och utfodring*

De generella förhållanden som anges i den Allmänna inledningen till del B gäller. Man bör dock sträva efter en relativ luftfuktighet på 50–60 %.

1.4.1.3 *Förberedelse av djuren*

Friska, unga vuxna djur väljs ut slumpartat för placering i kontroll- och behandlingsgrupperna. Burar bör arrangeras på ett sådant sätt att möjliga effekter beroende på placeringen av burarna blir så små som möjligt. Djuren ska ha en unik identifiering. De bör vänjas vid förhållandena i laboratoriet under minst fem dagar innan undersökningen börjar.

▼B

1.4.1.4 *Beredning av doser*

Festa testsubstanser bör lösas upp i eller blandas med lämpliga lösningsmedel eller vehiklar och spädas ut, om så är lämpligt, innan dosen administreras till djuren. Testsubstanser i flytande form kan doseras direkt eller spädas ut före dosering. Nygjorda beredningar av testsubstansen bör användas, om inte stabilitetsdata visar att lagring är acceptabel.

1.4.2 **Försöksbetingelser**

1.4.2.1 *Lösningsmedel/vehikel*

Lösningsmedlet/vehikeln bör inte ge upphov till toxiska effekter vid de dosnivåer som används och bör inte kunna misstänkas för att reagera kemiskt med testsubstansen. Om andra lösningsmedel/vehiklar än gängse brukliga används, bör användningen av dem ha stöd från data som visar på deras kompatibilitet. När det är möjligt, rekommenderas att man i första hand överväger att använda vattenbaserade lösningsmedel/vehiklar.

1.4.2.2 *Kontroller*

Samtidiga positiva och negativa (lösningsmedel/vehikel) kontroller bör inkluderas i varje test. Utom vid behandling med testsubstansen, bör försöksdjuren i kontrollgrupperna hanteras på ett sätt om är identiskt med sättet för försöksdjuren i de grupper som behandlas.

Positiva kontroller bör de strukturella kromosomavvikelser *in vivo* i spermatogoniala celler när administrering sker vid exponeringsnivåer som förväntas ge en detekterbar ökning i förhållande till bakgrunden.

Positiva kontrolldoser bör väljas på ett sådant sätt att effekterna är tydliga men inte omedelbart avslöjar identiteten hos kodade utstryksglas för läsaren. Det är acceptabelt att den positiva kontrollen administreras via en annan tillförselväg än testsubstansen och att provtagningen endast sker vid ett tillfälle. Dessutom kan användningen av kemiska klassrelaterade positiva kontrollkemikalier övervägas när sådana finns att tillgå. 1 tabellen nedan ges några exempel på positiva kontrollsubstanser.

Substans	CAS-nummer	Einecs-nummer
Cyklofosfoamid Cyklofosfoamidmonohydrat	50-18-0 6055-19-2	200-015-4
Cyclohexylamin	108-91-8	203-629-0
Mitomycin C	50-07-7	200-008-6
Monomer akrylamid	79-06-1	201-173-7
Trietylenmelamin	51-18-3	200-083-5

Negativa kontroller, behandlade med enbart ett lösningsmedel eller en vehikel, och i övrigt behandlade på samma sätt som behandlingsgrupperna, bör inkluderas för varje provtagningstillfälle, om inte acceptabel variabilitet och frekvens för celler med kromosomavvikelser mellan försöksdjuren kan påvisas från historiska kontrolldata. Dessutom bör obehandlade kontroller även användas, om det inte finns historiska eller publicerade kontrolldata som visar att inga skadliga eller mutagena effekter induceras av det valda lösningsmedlet/vehikeln.

▼B

1.5 FÖRFARANDE

1.5.1 **Antal försöksdjur**

Varje behandlad grupp och kontrollgrupp måste inkludera minst fem analyserbara hanar.

1.5.2 **Behandlingsschema**

Testsubstanser bör lämpligen administreras en eller två gånger (dvs. som en enstaka behandling eller som två behandlingar). Testsubstanser kan även administreras i form av en delad dos, dvs. två behandlingar under samma dag med högst några timmars intervall, för att underlätta administrering av stora volymer. Andra doseringsscheman bör vara vetenskapligt motiverade.

I den högsta dosgruppen används två provtagningstider efter behandlingen. Eftersom cellcykelns kinetik kan påverkas av testsubstansen, används en tidig och en sen provtagningstid vid ungefär 24 och 48 timmar efter behandlingen. För andra doser än den högsta dosen bör en provtagningstid vid 24 timmar eller 1,5 cellcyklers längd efter behandlingen användas, om inte andra provtagningstider är kända för att vara lämpligare för detektion av effekter (6).

Dessutom kan andra provtagningstider användas. När det t.ex. gäller fall där kemikalier kan inducera kromosom-”lagging”, eller när de kan ge upphov till S-oberoende effekter, kan tidigare provtagningstider visa sig vara lämpligare (1).

Man måste i varje enskilt fall fastställa om det är lämpligt att använda ett upprepat behandlingsschema. Efter ett upprepat behandlingsschema bör försöksdjuren avlivas 24 timmar (1,5 gånger cellcykelns längd) efter den sista behandlingen. Ytterligare provtagningstider kan användas där så är lämpligt.

Innan avlivningen sker, injiceras försöksdjuren intraperitonealt med en lämplig dos av en substans som stoppar celldelningen i metafas (t.ex. Colcemid® eller colchicin). Provtagning på försöksdjur sker därefter med lämpliga intervall. För möss ligger detta intervall på ungefär 3–5 timmar och för kinesiska hamstrar ligger intervallet pä ungefär 4–5 timmar.

1.5.3 **Dosnivåer**

Om det inte finns några lämpliga data tillgängliga och en undersökning därför utförs för att fastställa omfattningen, bör denna undersökning utföras i samma laboratorium, och med samma arter, stammar och behandlingsschema som senare ska användas i huvudundersökningen. Vid toxicitet används tre dosnivåer för det första provtagningstillfället. Dessa dosnivåer bör täcka in ett intervall som sträcker sig från maximal till liten eller ingen toxicitet. Vid senare provtagningstillfällen räcker det med att endast den högsta dosen används. Den högsta dosen definieras som den dos som producerar tecken på toxicitet och så att högre dosnivåer baserade på samma doseringsschema skulle förväntas leda till att försöksdjuret dör.

▼B

Substanser med specifika biologiska verkningar vid låga icke-toxiska doser (såsom hormoner och mitogena substanser) kan utgöra undantag från kriterier som är dosbestämmande och bör utvärderas ifrån fall till fall. Den högsta dosen kan även definieras som en dos vilken ger upphov till någon indikation på toxicitet i den spermatogoniala cellerna (t.ex. en reduktion i kvoten av spermatogoniala mitoser hos de första och andra meiotiska metafaserna; denna reduktion bör inte överskrida 50 %).

1.5.4 **”Limit-test”**

En fullständig undersökning med tre dosnivåer kan inte anses vara nödvändig om ett test på en dosnivå vid minst 2 000 mg/kg kroppsvikt och med en enstaka behandling, eller i form av två behandlingar under samma dag, inte per upphov till observerbara toxiska effekter, och om ingen genotoxicitet kan förväntas utifrån data om strukturellt relaterade substanser. En förväntad exponering av människor kan visa på behovet av att en högre dosnivå används i ”limit-testen”.

1.5.5 **Administrering av doser**

Testsubstansen administreras normalt genom sondmatning med hjälp av en magsond, en lämplig intuberingskanyl eller genom en intraperitoneal injektion. Andra tillförselvägar för exponering kan vara acceptabla där de kan motiveras. Den maximala vätskevolymen som kan administreras med hjälp av sondmatning eller injektion vid ett tillfälle beror på försöksdjurets storlek. Volymen bör inte överstiga 2 ml/100 g kroppsvikt. Användning av volymer som är större än dessa måste motiveras. Förutom för irriterande eller korrosiva substanser, som normalt kommer att visa på stegrade effekter med högre koncentrationer, bör variationer av testvolymen minimeras genom att en justering av koncentrationen sker för att säkerställa att volymen är konstant vid alla dosnivåer.

1.5.6 **Kromosomberedning**

Omedelbart efter avlivning, tas cellsuspensioner ut från en eller båda testiklarna, exponeras för en hypoton lösning och fixeras. Cellerna stryks sedan ut på utstryksglas och färgas in.

1.5.7 **Analys**

För varje försöksdjur bör minst 100 väl spridda metafaser analyseras (dvs. ett minimum på 500 metafaser per grupp). Detta antal skulle kunna reduceras när ett stort antal avvikelser observeras. Alla utstryksglas, inklusive de från positiva och negativa kontroller, bör få en oberoende kodning innan den mikroskopiska analysen utförs. Eftersom fixeringsprocedurerena ofta resulterar i brott på en del av de celler som är i metafas, med förlust av kromosomer som följd, bör de celler som påvisas innehålla ett antal centromerer som motsvarar antalet 2 N ± 2.

2. **DATA**

2.1 BEHANDLING AV RESULTATEN

Individuella data från försöksdjur bör presenteras i tabellform. Den experimentella enheten utgörs av försöksdjuret. För varje individuellt försöksdjur bör antalet celler med strukturella kromosomavvikelser och antalet kromosomavvikelser per cell utvärderas. Olika typer av strukturella kromosomavvikelser bör listas med antal och frekvenser för behandlade grupper och kontrollgrupper. Luckor i DNA-strängen registreras separat och rapporteras men inkluderas i allmänhet inte i den totala avvikelse frekvensen.

▼B

Om såväl mitos som meios observeras, bör förhållandet mellan spermatogoniala mitoser och de första och andra meiotiska metafaserna fastställas som ett mått på cytotoxicitet för alla behandlade och negativa kontrollförsöksdjur vid ett totalt prov pä 100 celler som delar sig per djur för att etablera en möjligt cytotoxisk effekt. Om endast mitos kan observeras, bör mitosindexet bestämmas i minst 1 000 celler för varje försöksdjur.

2.2 UTVÄRDERING OCH TOLKNING AV RESULTATEN

Det finns ett flertal kriterier som används för att bestämma om ett resultat är positivt, t.ex. en dosrelaterad ökning av det relativa antalet celler med kromosomavvikelser eller en tydlig ökning av antalet celler hos en grupp som fått en enstaka dos vid ett enstaka provtagningstillfälle. Man bör i första hand överväga resultatets biologiska relevans. Statistiska metoder kan användas som en hjälp vid utvärdering av testresultatet (8). Tvetydiga resultat bör klarläggas genom fortsatta tester, lämpligen vid ändrade experimentella betingelser.

En testsubstans för vilken resultatet inte uppfyller ovanstående kriterier anses vara icke-mutagen i detta test.

Även om de flesta experiment kommer att ge tydligt positiva eller negativa resultat, så kan i sällsynta fall uppsättningen av data göra det omöjligt att utföra en otvetydig bedömning med avseende på testsubstansens aktivitet. Resultatet kan förbli tvetydigt eller tveksamt, oavsett hur många gånger som experimentet upprepas.

Positiva resultat från *in vivo*-test för spermatogoniala kromosomavvikelser indikerar att testsubstansen inducerar strukturella kromosomavvikelser i könscellerna hos den art som testas. Negativa resultat indikerar att testsubstansen, under försöksbetingelserna, inte inducerar kromosomavvikelser i könscellerna på den art som testas.

Sannolikheten för att testsubstansen eller dess metaboliter når målvävnaden bör diskuteras.

3. **RAPPORTERING**

TESTRAPPORT

Testrapporten måste innehålla följande information:

Lösningsmedel/vehikel:

— motivering av valet av vehikel

— testsubstansens löslighet och stabilitet i lösningsmedlet/vehikeln, om detta är känt

Försöksdjur:

— art/stam som används

— försöksdjurens antal och ålder

— ursprung, förhållanden vid förvaring, diet, etc.

— individuell vikt hos försöksdjuren vid försökets början, inklusive kroppsviktsintervallet, medelvärde och standardavvikelse för varje grupp

▼B

Försöksbetingelser:

— data från en omfångsundersökning, om en sådan genomförts

— grund för valet av dosnivå

— grund för administrationsvägen

— uppgifter om beredningen av testsubstansen

— uppgifter om administreringen av testsubstansen

— grund för avlivningstiderna

— omvandling från koncentration av testsubstansen i diet/dricksvatten (ppm) till den verkliga dosen (mg/kg kroppsvikt/dag), om detta är tillämpbart

— uppgifter om fodrets och vattnets kvalitet

— detaljerad beskrivning av behandlings- och provtagningsscheman

— metoder för mätningar av toxicitet

— identiteten hos substanser som stoppar cellcykeln i metafas, deras koncentration och behandlingens varaktighet

— metoder för preparation av utstryksglas

— kriterier för hur avvikelser påvisas

— antalet celler som analyserats per försöksdjur

— kriterier för bedömning av om undersökningarna är positiva, negativa eller tvetydiga

Resultat:

— tecken på toxicitet

— mitotiskt index

— förhållandet mellan spermatogoniala mitosceller och de första och andra meiotiska metafaserna

— typ av och antal avvikelser, angivna separat för varje försöksdjur

— det totala antalet avvikelser per grupp

— antalet celler med avvikelser per grupp

— dos/respons-förhållande, där så är möjligt

— statistiska analyser, om några sådana förekommer

— samtidiga negativa kontrolldata

— historiska negativa kontrolldata med omfång, medelvärden och standardavvikelser

— samtidiga positiva kontrolldata

— förändringar i ploiditet, om sådana har observerats

Diskussion av resultaten.

Slutsatser.

▼B

4. **HÄNVISNINGAR**

1. Adler, 1. 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. and Magnusson, J. (eds) Liss, New York, s. 477–484.

2. Adler, I. D., (1984), Cytogenetic tests in Mammals, in: Mutagenicity Testing: a Practical Approach, (ed.) S. Venitt and J. M. Parry, 1RL Press, Oxford, Washington DC, s. 275–306.

3. Evans, E. P., Breckon, G. and Ford, C. E. (1964), An Air-drying Method for Meiotic Preparations from Mammalian Testes, Cytogenetics and Cell Genetics, 3, s. 289–294.

4. Richold, M., Ashby, J., Chandley, A., Gatehouse, D. G. and Henderson, L. (1990), *In Vivo* Cytogenetic 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.

5. Yamamoto, K. and Kikuchi, Y. (1978), A New Method for Preparation of Mammalian Spermatogonial Chromosomes, Mutation Res. 52, s. 207–209.

6. Adler, 1. D., Shelby M. D., Bootman, J., Favor, J., Generoso, W., Pacchierotti, F.. Shibuya, T. and 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, s. 313–318.

7. 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. and Richold, M. (1992), Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays, Mutagenesis, 7, s. 313–319.

8. Lovell, D. P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G. E., Clarc, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D. G. and Savage, J. R. K. (1989), Statistical Analysis of *In* Vivo Cytogenetic Assays, in: D. J. Kirkland (ed.), Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing, report, Part 111. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, s. 184–232.

▼M7

▼B

B.25 **TEST AVSEENDE ÄRFTLIG TRANSLOKATION PÅ MUS**

1. **METOD**

1.1 INLEDNING

Se allmän inledning till del B.

1.2 DEFINITIONER

Se allmän inledning till del B.

1.3 REFERENSÄMNEN

Inga.

1.4 TESTMETODSPRINCIP

Vid test av ärftlig translokation hos mus konstateras strukturella och numeriska kromosomförändringar i däggdjursceller uttryckt i förstagenerationens avkomma. De kromosomförändringar som mäts är reciproka translokationer och, när avkomman även omfattar hondjur, förlust av en X-kromosom. Bärare av translokationer och XO-hondjur har nedsatt fertilitet, vilket utnyttjas vid valet av F_1-avkomma för cytogenetisk analys. Vissa typer av translokationer (X-autosome och c-t-typen) orsakar fullständig sterilitet. Translokationer konstateras cytogenetiskt i meiosens diakines-metafas hos handjur, som antingen kan vara av F_1-generationen eller söner till F,-hondjur. XO-hondjur identifieras cytogenetiskt genom att kromosomtalet i benmärgsmitoser endast är 39.

1.5 KVALITETSKRITERIER

Inga.

1.6 METODBESKRIVNING

Förberedelser

Testämnet upplöses i isotonisk saltlösning. Ämnen som inte är lösliga i saltlösning ska lösas eller uppslammas i lämplig vehikel. Nyligen framställda lösningar av testämnet ska användas. Vehikel som används för att underlätta dosering får inte inverka på testämnet eller framkalla toxiska effekter.

Tillförselväg

Vanligen tillförs testämnet genom oral intubering eller intraperitoneal injicering. Även andra tillförselvägar kan användas.

Försöksdjur

Som försöksdjur används mus eftersom det är enklast med hänsyn till uppfödning och cytologisk verifikation. Ingen särskild stam krävs. Om man planerar att testa fertiliteten bör den använda stammens genomsnittliga kullstorlek vara över åtta och relativt konstant.

Friska könsmogna djur används.

▼B

Antal djur

Det antal djur som behövs beror på den spontana translokationsfrekvensen och den induktionsfrekvens som är nödvändig för att uppnå ett positivt resultat.

Normalt görs testet genom undersökning av F_1-handjur. Minst 500 F_1-handjur undersöks per dos. Om även kvinnlig F_1-avkomma används undersöks 300 av varje kön.

Användning av negativa och positiva kontroller

Tilllräckliga kontrolldata från sidlöpande och tidigare, kontrollförsök ska finnas tillgängliga. Om det finns godtagbara positiva kontrollresultat från tidigare försök vid samma laboratorium kan dessa användas istället för en sidlöpande positiv kontroll.

Dosnivåer

En dos testas, normalt den högsta dosen med minimal toxisk verkan, men utan inflytande på reproduktion eller överlevnad. Om förhållandet mellan dos och reaktion ska bestämmas används ytterligare två lägre doser. Icke-toxiska ämnen testas genom användning av så höga doser som möjligt.

Förfarande

Exponering efter parning

Två olika behandlingsscheman kan användas. I det mest använda schemat ges hela dosen på en gång. Testämnet kan också ges 7 dagar i veckan i 35 dagar. Antalet parningar efter exponeringen beror på exponeringsschemat och ska vara tillräckligt stort för att säkerställa att alla exponerade könscellstadier kan undersökas. Efter parningen placeras hondjuren i var sin bur. Vid födseln registreras datumet, kullstorleken och avkommans kön. Alla handjuren bland avkomman avvänjs och hondjuren avlägsnas såvida de inte inbegrips i försöket

Test av heterozygoti efter translokation

En av två möjliga metoder används:

— Fertilitetsundersökning av F_1-generationen med efterföljande verifikation av eventuella translokationsbärare genom cytologisk analys.

— Cytogenetisk analys av alla F_1-handjur utan föregående urval på grundval av fertilitetsundersökningar.

a) Fertilitetsundersökning

Nedsatt fertilitet hos F_1-generationens medlemmar kan konstateras vid observation av kullstorleken och/eller analys av de parade hondjurens livmoderinnehåll.

Kriterier för bestämning av normal och nedsatt fertilitet måste fastställas innan fläcktestet på mus inleds.

▼B

Observation av kullstorlek: De F_1-handjur som ska undersökas placeras i var sin bur tillsammans med hondjur från samma försök eller från bestånden. Från och med den 18:e dagen efter parning iakttas burarna dagligen. Kullstorleken och kön i F_2-generationen registreras vid födseln, varefter kullarna avlägsnas. Om F_1-hondjur testas bevaras de små F_2-kullarna för ytterligare undersökningar. Konstatering av om hondjur är translokationsbärare sker genom cytogenetisk analys av translokation hos någon av deras manliga avkomma. XO-hondjur identifieras genom ändring av förhållandet mellan han- och hondjur i deras avkomma från 1:1 till 1:2. Vid ett sekvensiellt ordnat förfarande elimineras normalt F_1-djur från den vidare undersökningen om storleken av den första F_2-kullen är lika med eller större än ett på förhand fastställt normalvärde. I motsatt fall observeras den andra eller tredje F_2-kullen.

F_1-djur som inte kan klassificeras som normala efter observation av upp till tre F_2-kullar underkastas antingen ytterligare undersökning genom analys av de parade hondjurens livmoderinnehåll eller direkt cytogenetisk analys.

Analys av innehållet i livmodern: Den mindre kullstorleken hos translokationsbärare skylls på att fostren dör på det embryonala stadiet vilket innebär att ett stort antal döda implantat tyder på translokation hos försöksdjuret. De F_1-handjur som ska undersökas paras vart och ett separat med upp till tre hondjur. Vid daglig undersökning mellan kl. 10 och kl. 12 på förmiddagen av förekomsten av vaginalpropp, konstateras om befruktning har skett. Hondjuren avlivas 14–16 dagar senare och antalet levande och döda implantat i livmodern registreras.

b) Cytogenetisk analys

Testpreparat framställs genom lufttorkningsteknik. Translokationsbärarna identifieras på grundval av multivalenta konfigurationer i primärar spermatocyters diakines-metafas I. Om det observeras minst två celler med multivalenta konfigurationer anses det bevisat att försöksdjuret är translokationsbärare.

När inget urval görs på grundval av fertilitetsundersökningar undersöks alla F_1-handjur cytogene-tiskt. Mikroskopisk undersökning görs av minst 25 diakines-metafaser I per handjur. F_1-handjur med små testiklar och defekt meiose innan diakines, samt $F_{1,}$-hondjur som förmodas vara XO-bärare, underkastas undersökning av mitotiska metafaser i spermatogoner eller benmärg. Om ovanligt långa och/eller korta kromosomer observeras i tio celler anses det bevisat att det är tal om en translokation som gör handjur sterila (c-typen). Vissa X-automsoma translokationer som gör handjur sterila kan endast identifieras genom bandanalys av mitosekromosomer. Om 39 kromosomer observeras i tio mitoser anses det bevisat att det är tal om ett XO-hondjur.

2. **DATA**

Data ställs upp i tabellform.

Den genomsnittliga kullstorleken och könsfördelningen i föräldragenerationens avkomma vid födseln och vid avvänjning anges för varje parningsperiod.

▼B

För bedömning av F_1-djurens fertilitet anges den genomsnittliga kullstorleken efter de normala parningarna och varje enskild kullstorlek efter parning av F_1-translokationsbärare. Efter analys av livmoderinnehåll anges det genomsnittliga antalet levande och döda implantat efter normala parningar och antalet levande och döda implantat efter varje enskild parning av F_1-translokationsbärare.

Efter cytogenetisk analys av diakines-metafaser I anges antalet multivalenta konfigurationer och det totala antalet undersökta celler för varje enskild translokationsbärare.

Det totala antalet parningar och parningsperiodernas längd anges för sterila F_1-djur. Detaljerade upplysningar lämnas om testikelvikt och cytogenetisk analys.

Den genomsnittliga kullstorleken, F_2-avkommans könsfördelning och resultaten av den cytogenetiska analysen anges för XO-hondjur.

Om eventuella F_1-translokationsbärare väljs ut vid fertilitetsundersökningar ska tabellerna innehålla upplysningar om hur många av de utvalda djuren som senare visade sig vara heterozygota efter translokation.

Data från negativa och positiva kontrollförsök rapporteras på liknande sätt.

3. **RAPPORTERING**

3.1 TESTRAPPORT

Testrapporten ska om möjligt innehålla minst följande uppgifter:

— Musstam, djurens ålder, de doserade djurens vikt, antal djur av varje kön i försöks- och kon trollgrupperna i föräldrageneration-en.

— Antal föräldradjur av varje kön i försöks- och kontrollgrupperna.

— Försöksbetingelser, detaljerad beskrivning av behandlingen av djuren, dosnivå, lösningsmedel, parningsschema.

— Avkommans antal och kön för varje enskilt hondjur, antal och kön av avkomma som föds upp för translokationsanalys.

— Tidpunkt och kriterier för translokationsanalys.

— Antal translokationsbärare samt detaljerad beskrivning av dessa, inbegripet avlivningsdata och upplysningar om livmoderinnehåll, om sådana finns.

— Cytogenetiska förfaranden och detaljerade upplysningar om den mikroskopiska analysen, helt med bilder.

— Statistisk utvärdering.

— Diskussion om resultaten.

— Tolkning av resultaten.

▼B

3.2 UTVÄRDERING OCH TOLKNING

Se allmän inledning till del B.

4. **HÄNVISNINGAR**

Se allmän inledning till del B.

▼B

B.26 TEST AVSEENDE SUBKRONISK ORAL TOXICITET 90 DAGARS UPPREPAT ORALTEST PÅ GNAGARE

1. METOD

Denna testmetod för subkronisk oral toxicitet motsvarar OECD TG 408 (1998).

1.1 INLEDNING

Vid bedömning och utvärdering av en kemikalies toxiska egenskaper kan bestämningen av subkronisk oral toxicitet med användning av upprepade doser genomföras efter det att man har fått preliminär toxicitetsinformation från test avseende akut toxicitet eller från test med upprepad dosering (28 dagar). Från 90-dagarstestet fås information om eventuella hälsoskador som kan uppstå till följd av upprepad exponering under en lång tidsperiod som täcker mognaden efter avvänjning och uppväxten ända in i vuxenstadiet. Genom testet fås information om de mest betydande toxiska verkningarna, indikation om vilka organ som påverkas och huruvida det finns en risk för ackumulering. Likaså kan man få en uppskattning om en exponeringsnivå vid vilken inga skadliga verkningar observeras. Denna information kan användas för att välja dosnivåer för test avseende kronisk toxicitet och för att fastställa säkerhetskriterier gällande exponering på människor.

Metoden innebär starkare betoning av neurologiska slutpunkter (endpoints) och ger indikationer om immunologiska och reproduktionstoxiska verkningar. Likaså betonas behovet av noggranna kliniska observationer av djuren i syfte att få fram så mycket information som möjligt. Testets syfte är att möjliggöra identifiering av kemikalier som har potential att framkalla sådana neurotoxiska, immunologiska eller reproduktionstoxiska verkningar som kan motivera närmare undersökningar.

Se även Allmän inledning, del B.

1.2 DEFINITIONER

Dos: Den mängd testämne som tillförs. Dosen uttrycks som vikt (g, mg), som vikten testämne per viktenhet försöksdjur (t.ex. mg/kg) eller som en konstant utfodringskoncentration (ppm).

Dosering: Ett allmänt begrepp som inbegriper dos, dess frekvens och varaktighet.

NOAEL: Förkortning för ”no-observed-adverse-effect level” (nivå vid vilken inga skadliga verkningar observeras). Avser den högsta dosnivån vid vilken inga skadliga behandlingsrelaterade verkningar kan observeras.

1.3 PRINCIP FÖR TESTMETODEN

Testämnet tillförs oralt dagligen under 90 dagar i stegvis ökande doser till flera grupper försöksdjur, en dosnivå per grupp. Under denna period observeras djuren noggrant för att se om de uppvisar några tecken som tyder på att testämnet är toxiskt. Djur som dör eller avlivas under testet obduceras och vid testets slut avlivas de överlevande djuren och obduceras.

▼B

1.4 BESKRIVNING AV TESTMETODEN

1.4.1 **Förberedelse av djuren**

För testet används friska djur som har acklimatiserats till laboratoriemiljön under minst fem dagar och som inte har använts för tidigare test. Försöksdjuren bör karakteriseras enligt art, stam, ursprung, kön, vikt och ålder. Djuren fördelas slumpvis i kontroll- och behandlingsgrupper. Burarna placeras på sådant sätt att eventuella verkningar på grund av placeringen minimeras. Varje djur tilldelas ett unikt identifieringsnummer.

1.4.2 **Förberedelse av doserna**

Testämnet tillförs via sondmatning, foder eller dricksvatten. Den metod som väljs för oral tillförsel beror på testets syfte och testämnets fysikalisk-kemiska egenskaper.

Vid behov kan testämnet lösas upp eller suspenderas i en lämplig vehikel. Om möjligt bör man i första hand överväga vattenlösning eller vattensuspension, sedan oljelösning eller oljeemulsion (t.ex. majsolja) och därefter eventuella övriga vehiklar. I fråga om andra vehiklar än vatten måste de toxiska egenskaperna vara kända. Testämnets stabilitet vid tillförselförhållandena bör fastställas.

1.4.3 **Testförhållanden**

1.4.3.1 *Försöksdjur*

Rekommenderat försöksdjur är råtta, även om testet kan utföras med andra gnagare (t.ex. mus). Djuren bör vara unga och friska vuxna exemplar som härrör från normala laboratoriestammar. Hondjuren får inte ha fött ungar och får inte vara dräktiga. Doseringen bör inledas snarast möjligt efter avvänjningen och under alla förhållanden innan djuren är nio veckor gamla. Vid testets början bör variationen i vikt mellan de använda djuren vara minimal och får inte överstiga ± 20 % av vardera könets medelvikt. Om testet utförs som inledning till ett långtidstest avseende kronisk toxicitet måste djur från samma stam och ursprung användas för båda testen.

1.4.3.2 *Antal och kön*

Minst 20 djur (tio honor och tio hanar) bör användas för varje dosnivå. Om avlivningar är inplanerade under testets gång bör antalet djur ökas med det antal djur som avlivas innan testet har slutförts. Beroende på tidigare kunskaper om kemikalien eller en nära besläktad kemikalie bör man överväga att ta med ytterligare en satellitgrupp på tio djur (fem per kön) för kontrollgruppen och toppdosgruppen. Efter behandlingsperioden observeras satellitgruppen med avseende på reversibla eller kvarstående toxiska verkningar. Längden för denna period fastställs med beaktande av de observerade verkningarna.

▼B

1.4.3.3 *Dosnivåer*

Minst tre dosgrupper och en parallell kontrollgrupp bör användas, utom om gränstest utförs (se 1.4.3.4). Dosnivåerna kan basera sig på resultaten från test med upprepad dos eller från preliminära test för dosbestämning, och de bör fastställas med beaktande av alla toxikokinetiska data som finns tillgängliga för testämnet eller närbesläktade ämnen. Den högsta dosnivån väljs så att den framkallar toxiska verkningar utan att orsaka dödsfall eller svårt lidande, förutsatt att det inte finns begränsningar som beror på testämnets fysikalisk-kemiska natur eller biologiska verkningar. Därefter väljs dosnivåerna i fallande skala så att en dosrelaterad respons kan påvisas, och samtidigt så att inga påvisbara skadliga verkningar (NOAEL) kan observeras vid den lägsta dosnivån. Två- till fyrfaldiga dosintervall är ofta optimala för de fallande dosnivåerna. Tillägg av en fjärde testgrupp är att föredra framför användning av mycket breda intervall mellan dosnivåerna (t.ex. en faktor som är större än cirka 6–10).

Kontrollgruppen är en obehandlad grupp, eller en vehikelkontrollgrupp om vehikel används för tillförsel av testämnet. Förutom att djuren i kontrollgruppen inte behandlas med testämnet bör de hanteras på exakt samma sätt som djuren i dosgrupperna. Om en vehikel används bör kontrollgruppen tillföras vehikeln i den största volym som används. Om testämnet tillförs via fodret och man märker att foderintaget minskar, kan det vara till fördel med en parallellt utfodrad kontrollgrupp för att kunna avgöra huruvida minskningen beror på att testämnet påverkar fodrets smak eller på att det förekommer toxikologiska förändringar i testmodellen.

Följande egenskaper hos vehikeln och övriga eventuella tillsatsämnen bör beaktas: verkningarna på absorption, distribution, metabolism eller kvarhållande av testämnet; verkningarna på testämnets kemiska egenskaper i den utsträckning dessa verkningar kan påverka testämnets toxiska egenskaper samt verkningarna på försöksdjurens foder- eller vattenintag eller deras näringstillstånd.

1.4.3.4 *Gränstest (Limit-test)*

Om ett test med en dosnivå om minst 1 000 mg per kg kroppsvikt och dag genomförs på det sätt som beskrivs här och inga toxiska verkningar kan observeras, och om toxicitet inte förväntas på grundval av uppgifter om strukturellt närbesläktade ämnen, kan ett fullständigt test med tre dosnivåer anses vara överflödigt. Gränstest tillämpas utom när exponering på människor indikerar att en högre dosnivå behövs.

1.5 FÖRFARANDE

1.5.1 **Tillförsel av doser**

Djuren ges dagliga doser av testämnet under 90 dagar. Varje annat doseringsschema, t.ex. dosering fem dagar per vecka, måste motiveras. Om testämnet tillförs genom sondmatning bör hela dosen tillföras på en gång via magsond eller lämplig intubationskanyl. Den största mängd vätska som kan tillföras vid ett och samma tillfälle beror på försöksdjurets storlek. Volymen får inte överstiga 1 ml per 100 g kroppsvikt utom i fråga om vattenlösningar för vilka 2 ml per 100 g kroppsvikt får användas. Med undantag för irriterande eller frätande ämnen som normalt ger kraftigare verkan med högre koncentration bör variationer i testvolym minimeras genom justering av koncentrationen, för att säkerställa en konstant volym på alla dosnivåer.

▼B

För ämnen som tillförs via foder eller dricksvatten är det viktigt att försäkra sig om att testämnet ges i kvantiteter som inte stör det normala näringsupptaget eller den normala vattenbalansen. När testämnet tillförs via fodret kan man använda en konstant koncentration (ppm) eller en konstant dosnivå i förhållande till djurens kroppsvikt. Det använda alternativet måste anges. När ett ämne tillförs genom sondmatning bör dosen ges vid samma tid varje dag och vid behov justeras dosen så att dosnivån hålls konstant i förhållande till djurens kroppsvikt. Om ett 90-dagarstest används som inledning till ett långtidstest avseende kronisk toxicitet måste samma foder användas i båda testen.

1.5.2 **Observationer**

Observationsperioden bör vara minst 90 dagar. Djur i en satellitgrupp avsedd för fortsatta observationer hålls obehandlade under en lämplig period så att man kan upptäcka kvarstående verkningar eller återhämtning från toxiska verkningar.

Generella kliniska observationer bör göras minst en gång per dag, helst vid samma tid(er) varje dag och med beaktande av perioden för när maximala verkningar förväntas efter dosering. Djurens hälsostatus bör registreras. Minst två gånger per dag, i regel i början och slutet av varje dag, undersöks alla djur i syfte att hitta döende eller döda djur.

Noggranna kliniska observationer görs minst en gång av alla djur före den första exponeringen (för att möjliggöra jämförelser på samma objekt) och därefter minst en gång i veckan. Dessa observationer bör göras utanför buren, helst på en ”standardarena” och vid samma tid på dagen varje gång. Observationerna bör noteras noggrant, helst genom ett poängsystem som testlaboratoriet har definierat exakt. Man bör eftersträva minimala variationer i observationsbetingelserna. Observationerna bör omfatta, men inte begränsas till, förändringar av hud, päls, ögon och slemhinnor, förekomst av sekret och utsöndringar samt autonom aktivitet (tårflöde, upprest päls, pupillstorlek, ovanligt andningsmönster). Förändringar i gång, hållning och reaktion på hantering liksom eventuella kramper eller spasmer, stereotypt beteende (t.ex. överdrivet putsande, eller att djuren springer runt i cirklar) eller bisarrt beteende (t.ex. självstympning, baklängesgång) bör också noteras (1).

Innan testämnet tillförs och efter avslutat test undersöks djuren oftalmologiskt med ett oftalmoskop eller motsvarande utrustning. Denna undersökning bör helst omfatta alla djur men åtminstone djuren i högdos- och kontrollgrupperna. Om ögonförändringar upptäcks bör alla djur undersökas.

Mot slutet av exponeringsperioden, och under alla förhållanden inte tidigare än vecka 11, görs en bedömning av den sensoriska reaktionen på stimuli (1) (t.ex. hörsel-, syn- och djupsensoriska stimuli) (2), (3), (4), samt bedömning av greppstyrka (5) och motorisk aktivitet (6). Närmare uppgifter om de förfaranden som kan följas finns i respektive hänvisning. Alternativt kan även andra förfaranden än de som nämns i hänvisningarna användas.

Mot slutet av testet kan funktionsobservationerna utelämnas om det finns uppgifter om motsvarande observationer tillgängliga från övriga test och man inte har kunnat konstatera några funktionsstörningar vid de dagliga kliniska observationerna.

▼B

I undantagsfall kan funktionsobservationerna också utelämnas för grupper vars djur i övrigt uppvisar tecken på toxicitet i en sådan utsträckning att det väsentligt skulle påverka funktionstestet.

1.5.2.1 *Kroppsvikt samt foder- och vattenkonsumtion*

Alla djur bör vägas minst en gång i veckan. Foder- och vattenkonsumtion bör mätas minst en gång varje vecka. Om testämnet tillförs via dricksvattnet bör även vattenkonsumtionen mätas minst en gång i veckan. Mätning av vattenkonsumtionen kan också övervägas för foder- eller sondmatningstest under vilka vattendrickandet kan förändras.

1.5.2.2 *Hematologi och klinisk biokemi*

Blodprov bör tas från ett angivet ställe och förvaras under lämpliga förhållanden. I slutet av testperioden tas blodprov strax före eller som ett led i avlivningsförfarandet.

Följande hematologiska undersökningar bör göras då testperioden avslutas och varje gång eventuella blodprover tas under testperiodens gång: hematokrit, hemoglobinkoncentration, räkning av röda blodkroppar, total-och differentialräkning av vita blodkroppar, blodplättsräkning samt mätning av koaguleringstid och koaguleringsförmåga.

Kliniska biokemiska bestämningar för att undersöka större toxiska effekter i vävnader, särskilt verkningar på lever och njurar, bör utföras på de blodprov som tas från alla djur strax före eller som ett led i avlivningsförfarandet (med undantag för de djur som hittas döende eller avlivas under testets gång). På samma sätt som för hematologiska undersökningar kan blodprover för kliniska biokemiska undersökningar tas under testets gång. Det rekommenderas att djuren fastar natten före blodprovstagningen ([1]). Undersökningarna av plasma eller serum bör omfatta natrium, kalium, glukos, totalkolesterol, urinämne, urinämneskväve, kreatinin, totalprotein och albumin, minst två enzymer som indikerar verkningar på leverceller (t.ex. alaninaminotransferas, aspartataminotransferas, alkaliskt fosfatas, gamma-glutamyltranspeptidas och sorbitoldehydrogenas). Mätningar av ytterligare enzymer (från lever eller av annat ursprung) och gallsyror kan under vissa förhållanden ge användbar information.

Eventuellt kan dessutom följande urinanalyser utföras under sista veckan av testet med uppsamling av urin på fasta tider: utseende, volym, osmolalitet eller specifik vikt, pH, protein, glukos och blod eller blodceller.

Dessutom bör undersökning av serummarkörer av allmänna vävnadsskador övervägas. Ytterligare bestämningar som bör utföras, i det fall att testämnets kända egenskaper kan eller misstänks påverka närbesläktade metaboliska profiler, omfattar kalcium, fosfor, fastevärden av triglycerider, specifika hormoner, metahemoglobin och kolinesteras. Dessa bestämningar behövs för kemikalier inom vissa klasser eller från fall till fall.

([1]) För vissa matningar som görs på serum och plasma, särskilt i fråga om glukos, är fasta över natten att föredra. Den viktigaste orsaken till detta är att resultaten annars oundvikligen uppvisar större variationer, vilket tenderar att maskera svaga verkningar och göra det svårare att tolka resultaten. Å andra sidan kan fasta över natten leda till störningar i djurens allmänna metabolism och särskilt i fråga om exponeringstest störa den dagliga exponeringen för testämnet. Om fasta över natten tillämpas bör de kliniska biokemiska bestämningarna göras efter funktionsobservationerna.

▼B

Överlag krävs en viss flexibilitet i fråga om tillvägagångssätt, beroende på djurart och på de observerade eller förväntade verkningarna av ett givet ämne.

Om historiska basdata är otillräckliga bör man överväga bestämning av hematologiska och kliniska biokemiska variabler innan doseringen påbörjas. I allmänhet rekommenderas inte att dessa uppgifter genereras före behandlingen (7).

1.5.2.3 *Obduktion*

Alla försöksdjur bör genomgå en fullständig obduktion som omfattar omsorgsfull yttre granskning av kroppen, alla kroppsöppningar samt kranium, bröst- och bukhåla och deras innehåll. Lever, njurar, binjurar, testiklar, bitestiklar, livmoder, äggstockar, bräss, mjälte, hjärna och hjärta från alla djur (med undantag för de djur som hittas döende eller avlivas under testets gång) putsas från angränsande vävnad och deras våtvikt bestäms så snart möjligt efter dissekering för att undvika uttorkning.

Följande vävnader och organ bör bevaras i det mest lämpade mediet med hänsyn till typen av vävnad och planerade efterföljande histopatologiska undersökningar: alla organ och vävnader med stora skador, hjärnan (representativa regioner inbegripet storhjärna, lillhjärna och hjärnbrygga), ryggrad (på tre nivåer: cervikal, thorakal (mellersta) och lumbal), hypofys, sköldkörtel, bisköldkörtel, bräss, matstrupe, salivkörtlar, magsäck, tunntarm och tjocktarm (inklusive Peyers plack), lever, bukspottkörtel, njurar, binjurar, mjälte, hjärta, luftstrupe och lungor (konserverade genom inflation med fixermedel och därefter immersion), aorta, könskörtlar, livmoder, accessoriska könsorgan, honornas bröstkörtlar, prostata, urinblåsa, gallblåsa (mus), lymfkörtlar (helst en lymfkörtel som omfattar tillförselvägen och en annan långt från tillförselvägen för att täcka systematiska effekter), perifer nerv (ischias- eller tibialnerven), helst nära muskeln, ett snitt av ryggmärgen (alternativt färskt benmärgsaspirat), hud och ögon (om förändringar har observerats under oftalmologiska undersökningar). Kliniska eller övriga fynd kan indikera att ytterligare vävnader behöver undersökas. Dessutom bör man bevara alla organ som på grund av testämnets kända egenskaper förmodas vara målorgan.

1.5.2.4 *Histopatologi*

En fullständig histopatologisk undersökning bör utföras på bevarade organ och vävnader från alla djur i kontroll- och högdosgrupperna. Om behandlingsrelaterade förändringar observeras i högdosgruppen bör undersökningarna utsträckas till djuren i alla övriga dosgrupper.

Alla stora skador bör undersökas.

Om en satellitgrupp används bör histopatologisk undersökning utföras på de vävnader och organ på vilka verkningar har konstaterats i dosgrupperna.

▼B

2. **DATA OCH RAPPORTERING**

2.1 DATA

Uppgifter bör rapporteras individuellt. Därutöver bör alla uppgifter sammanställas i en tabell över antalet djur i varje testgrupp vid testets början, antalet djur som hittats döda under testet eller som avlivats av humanitära skäl samt tidpunkten för avlivning, antalet djur som uppvisat tecken som tyder på att testämnet är toxiskt, en beskrivning av observerade tecken på toxicitet, inbegripet tidpunkten då sådana första gången upptäcktes, varaktighet och hur allvarliga de toxiska verkningarna är, antalet djur som har skador, typ av skada och procentandelen djur för varje typ av skada.

Om möjligt bör numeriska resultat utvärderas genom en tillämplig och allmänt godtagbar statistisk metod. De statistiska metoderna och data för vilka analys planeras bör väljas när testet utformas.

2.2 TESTRAPPORT

Testrapporten ska innehålla nedan angivna uppgifter.

2.2.1 **Testämne**

— Aggregationstillstånd, renhet och fysikalisk-kemiska egenskaper.

— Identifieringsdata.

— Vehikel (i förekommande fall). Motivering för val av vehikel, om annan än vatten.

2.2.2 **Försöksdjur**

— Art och stam som använts.

— Djurens antal, ålder och kön.

— Ursprung, förvaringsförhållanden, foder osv.

— Djurens individuella vikter vid testets början.

2.2.3 **Testförhållanden**

— Motivering för val av dosnivåer.

— Utförliga uppgifter om testämnets formulering och beredning av fodret, uppnådd koncentration, prepara tets stabilitet och homogenitet.

— Utförliga uppgifter om hur testämnet har tillförts.

— Faktiska doser (mg per kg kroppsvikt och dag) och omräkningsfaktor från testämneskoncentrationen i foder eller vatten (ppm) till faktisk dos, om tillämpligt.

— Uppgifter om foder- och vattenkvalitet.

2.2.4 **Resultat**

— Kroppsvikt och förändringar av kroppsvikt.

— Foderkonsumtion och i tillämpliga fall vattenkonsumtion.

— Uppgifter om toxiska reaktioner per kön och dosnivå, inklusive tecken på toxicitet.

▼B

— Art, grad och varaktighet för kliniska observationer (oavsett om de är reversibla eller inte).

— Resultat av oftalmologisk undersökning.

— Bedömning av sensorisk aktivitet, greppstyrka och motorisk aktivitet (i mån av tillgänglighet).

— Blodundersökningar med relevanta basvärden.

— Kliniska biokemiska undersökningar med relevanta basvärden.

— Kroppsvikt vid avlivning, organvikt och förhållandena mellan organ- och kroppsvikt.

— Obduktionsfynd.

— En detaljerad beskrivning av alla histopatologiska fynd.

— Absorptionsdata om de finns tillgängliga.

— Statistisk bearbetning av resultaten, i tillämpliga fall.

Diskussion om resultaten.

Slutsatser.

3. **HÄNVISNINGAR**

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 Neurologic Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp., 40, pp. 999–1003.

3. Gad, S. C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial 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 Hindlimb 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 TEST AVSEENDE SUBKRONISK ORAL TOXICITET 90 DAGARS UPPREPAT ORALTEST PÅ ICKE-GNAGARE

1. METOD

Denna testmetod för subkronisk oral toxicitet motsvarar OECD TG 409 (1998).

1.1 INLEDNING

Vid bedömning och utvärdering av en kemikalies toxiska egenskaper kan bestämningen av subkronisk oral toxicitet med användning av upprepade doser genomföras efter det att man har fått preliminär toxicitetsinformation från test avseende akut toxicitet eller från test med upprepad dosering (28 dagar). Genom 90-dagarsstestet fås information om eventuella hälsoskador som kan uppstå till följd av upprepad exponering under en period av snabb tillväxt och in i ungt vuxenstadium. Genom testet fås information om de mest betydande toxiska verkningarna, indikation om vilka organ som påverkas och huruvida det finns en risk för ackumulering. Likaså kan man få en uppskattning om en exponeringsnivå vid vilken inga skadliga verkningar observeras. Denna information kan användas för att välja dosnivåer för test avseende kronisk toxicitet och för att fastställa säkerhetskriterier gällande exponering på människor.

Testmetoden kan användas för identifiering av skadliga verkningar hos icke-gnagare som utsätts för exponering av en kemikalie och den bör endast användas i följande fall:

— Verkningar som har observerats i övriga test indikerar att det finns ett behov av förtydligande eller karakterisering med hjälp av en art som inte är gnagare.

— Toxikokinetiska test indikerar att en specifik art av icke-gnagare är det mest relevanta alternativet för valet av försöksdjur.

— Andra särskilda orsaker motiverar att en art som inte är gnagare används.

Se även Allmän inledning, del B.

1.2 DEFINITIONER

Dos: Den mängd testämne som tillförs. Dosen uttrycks som vikt (g, mg), som vikten testämne per viktenhet försöksdjur (t.ex. mg/kg) eller som en konstant utfodringskoncentration (ppm).

Dosering: Ett allmänt begrepp som inbegriper dos, dess frekvens och varaktighet.

NOAEL: Förkortning för ”no-observed-adverse-effect level” (nivå vid vilken inga skadliga verkningar observeras). Avser den högsta dosnivån vid vilken inga skadliga behandlingsrelaterade verkningar kan observeras.

1.3 PRINCIP FÖR TESTMETODEN

Testämnet tillförs oralt dagligen under 90 dagar i stegvis ökande doser till flera grupper försöksdjur, en dosnivå per grupp. Under denna period observeras djuren noggrant för att se om de uppvisar några tecken som tyder på att testämnet är toxiskt. Djur som dör eller avlivas under testet obduceras och vid testets slut avlivas de överlevande djuren och obduceras.

▼B

1.4 BESKRIVNING AV TESTMETODEN

1.4.1 **Val av djurart**

En ofta använd icke-gnagare är hund. Hunden bör vara av definierad ras, ofta används beagle. Även andra arter, t.ex. svin eller minigrisar, kan användas. Primater rekommenderas inte och användning av dem måste motiveras. Djuren bör vara unga och friska. När det gäller hund bör doseringen helst inledas vid 4–6 månaders ålder och aldrig senare än vid 9 månaders ålder. Om testet utförs som inledning till ett långtidstest avseende kronisk toxicitet måste djur av samma art och ras användas för båda testen.

1.4.2 **Förberedelse av djuren**

För testet används unga och friska djur som har acklimatiserats till laboratoriemiljön och som inte har använts för tidigare test. Acklimatiseringsperiodens längd beror på djurarterna och deras ursprung. För hund eller för ändamålet uppfödda svin från en resident koloni rekommenderas minst fem dagar och för djur av externt ursprung rekommenderas minst två veckor. Försöksdjuren bör karakteriseras enligt art, stam, ursprung, kön, vikt och ålder. Djuren fördelas slumpvis i kontroll- och behandlingsgrupper. Burarna placeras på sådant sätt att eventuella verkningar på grund av placeringen minimeras. Varje djur tilldelas ett unikt identifieringsnummer.

1.4.3 **Beredning av doserna**

Testämnet kan tillföras via foder eller dricksvatten, genom sondmatning eller i kapslar. Den metod som väljs för oral tillförsel beror på testets syfte och testämnets fysikalisk-kemiska egenskaper.

Vid behov kan testämnet lösas upp eller suspenderas i en lämplig vehikel. Om möjligt bör man i första hand överväga vattenlösning eller vattensuspension, sedan oljelösning eller oljeemulsion (t.ex. majsolja) och därefter eventuellt andra vehiklar. I fråga om andra vehiklar än vatten måste de toxiska egenskaperna vara kända. Testämnets stabilitet vid tillförselförhållandena bör fastställas.

1.5 FÖRFARANDE

1.5.1 **Djurens antal och kön**

Minst åtta djur (fyra honor och fyra hanar) bör användas för varje dosnivå. Om avlivningar är inplanerade under testets gång bör antalet djur ökas med det antal djur som avlivas under testets gång. Antalet djur vid testets slut måste vara tillräckligt med tanke på en meningsfylld utvärdering av de toxiska verkningarna. Beroende på tidigare kunskaper om ämnet eller en nära besläktad kemikalie bör man överväga att ta med ytterligare en satellitgrupp på åtta djur (fyra per kön) för kontrollgruppen och toppdosgruppen. Efter behandlingsperioden observeras satellitgruppen med avseende på reversibla eller kvarstående toxiska verkningar. Längden för denna period fastställs med beaktande av de observerade verkningarna.

▼B

1.5.2 **Dosering**

Minst tre dosgrupper och en parallell kontrollgrupp bör användas, utom om gränstest utförs (se 1.5.3). Dosnivåerna kan basera sig på resultaten från test med upprepad dos eller från preliminära test för dosbestämning och de fastställs med beaktande av alla toxikokinetiska data som finns tillgängliga för testämnet eller närbesläktade ämnen. Den högsta dosnivån väljs så att den framkallar toxiska verkningar utan att orsaka dödsfall eller svårt lidande, förutsatt att det inte finns begränsningar som beror på testämnets fysikaliskkemiska natur eller biologiska verkningar. Därefter väljs dosnivåerna i fallande skala så att en dosrelaterad reaktion kan påvisas, medan inga påvisbara skadliga verkningar (NOAEL) bör uppstå vid den lägsta dosnivån. Två- till fyrfaldiga dosintervall är ofta optimala för de fallande dosnivåerna. Tillägg av en fjärde testgrupp är att föredra framför användning av mycket breda intervall mellan dosnivåerna (t.ex. över en faktor på cirka 6–10).

Kontrollgruppen är en obehandlad grupp, eller en vehikelkontrollgrupp om vehikel används för tillförsel av testämnet. Förutom att djuren i kontrollgruppen inte behandlas med testämnet bör de hanteras på exakt samma sätt som djuren i dosgrupperna. Om en vehikel används bör kontrollgruppen tillföras vehikeln i den största volym som används. Om testämnet tillförs via fodret och man märker att foderintaget minskar, kan det vara till fördel med en parallellt utfodrad kontrollgrupp for att kunna avgöra huruvida minskningen beror på att testämnet påverkar fodrets smak eller på att det förekommer toxikologiska förändringar i test-modellen.

Följande egenskaper hos vehikeln och övriga eventuella tillsatsämnen bör beaktas: verkningarna på absorption, distribution, metabolism eller kvarhållande av testämnet; verkningarna på testämnets kemiska egenskaper i den utsträckning dessa verkningar kan påverka testämnets toxiska egenskaper samt verkningarna på försöksdjurens foder- eller vattenintag eller deras näringstillstånd.

1.5.3 **Gränstest (Limit-test)**

Om ett test med en dosnivå om minst 1 000 mg per kg kroppsvikt och dag genomförs på det sätt som beskrivs här och inga toxiska verkningar kan observeras, och om toxicitet inte förväntas på grundval av uppgifter om strukturellt närbesläktade ämnen, kan ett fullständigt test med tre dosnivåer anses vara överflödigt. Gränstest tillämpas utom när exponering på människor indikerar att en högre dosnivå behövs.

1.5.4 **Tillförsel av doser**

Djuren ges dagliga doser av testämnet under 90 dagar. Varje annat doseringsschema, t.ex. dosering fem dagar per vecka, måste motiveras. Om testämnet tillförs genom sondmatning bör hela dosen tillföras på en gång via magsond eller lämplig intubationskanyl. Den största mängd vätska som kan tillföras vid ett och samma tillfälle beror på försöksdjurets storlek. I regel bör volymen hållas så låg som möjligt. Med undantag för irriterande eller frätande ämnen som normalt ger kraftigare verkan med högre koncentration bör variationer i testvolym minimeras genom justering av koncentrationen, för att säkerställa en konstant volym på alla dosnivåer.

▼B

För ämnen som tillförs via foder eller dricksvatten är det viktigt att försäkra sig om att testämnet ges i kvantiteter som inte stör det normala näringsupptaget eller den normala vattenbalansen. När testämnet tillförs via fodret kan man använda en konstant koncentration (ppm) eller en konstant dosnivå i förhållande till djurens kroppsvikt. Det använda alternativet måste anges. För ett ämne som tillförs genom sondmatning eller kapslar bör dosen ges vid samma tid varje dag och vid behov justeras så att dosnivån hålls konstant i förhållande till djurens kroppsvikt. Om ett 90-dagarstest används som inledning till ett långtidstest avseende kronisk toxicitet måste samma foder användas i båda testen.

1.5.5 **Observationer**

Observationsperioden bör vara minst 90 dagar. Djur i en satellitgrupp avsedd för fortsatta observationer hålls obehandlade under en lamplig period så att man kan upptäcka kvarstående verkningar eller återhämtning från toxiska verkningar.

Generella kliniska observationer bör göras minst en gång per dag, helst vid samma tid(er) varje dag och med beaktande av perioden för när maximala verkningar förväntas efter dosering. Djurens hälsostatus bör registreras. Minst två gånger per dag, i regel i början och slutet av varje dag, undersöks alla djur i syfte att hitta döende eller döda djur.

Noggranna kliniska observationer görs minst en gång av alla djur före den första exponeringen (för att möjliggöra jämförelser på samma objekt) och därefter minst en gång i veckan. Dessa observationer bör göras, när det är genomförbart, utanför buren, helst på en ”standardarena” och vid samma tidpunkt varje gång. Man bör eftersträva minimala variationer i observationsbetingelserna. Alla tecken på toxicitet bör registreras i detalj, inklusive tidpunkt för första upptäckt, svårighetsgrad och varaktighet. Observationerna bör omfatta, men inte begränsas till, förändringar av hud, päls, ögon och slemhinnor, förekomst av sekret och utsöndringar samt autonom aktivitet (tårflöde, upprest päls, pupillstorlek, ovanligt andningsmönster). Förändringar i gång, hållning och reaktion på hantering liksom eventuella kramper eller spasmer, stereotypt beteende (t.ex. överdrivet putsande, eller att djuren springer runt i cirklar) eller eventuellt bisarrt beteende (t.ex. självstympning, baklängesgång) bör också noteras.

Innan testämnet tillförs och efter avslutat test undersöks djuren oftalmologiskt med ett oftalmoskop eller motsvarande utrustning. Denna undersökning bör helst omfatta alla djur men åtminstone djuren i högdos-och kontrollgrupperna. Om behandlingsrelaterade ögonförändringar upptäcks bör alla djur undersökas.

1.5.5.1 *Kroppsvikt samt foder- och vattenkonsumtion*

Alla djur bör vägas minst en gång i veckan. Foder- och vattenkonsumtion bör mätas minst en gång varje vecka. Om testämnet tillförs via dricksvattnet bör även vattenkonsumtionen mätas minst en gång i veckan. Mätning av vattenkonsumtionen kan också övervägas för test med tillförsel via foder eller sond under vilka vattendrickandet kan förändras.

▼B

1.5.5.2 *Hematologi och klinisk biokemi*

Blodprov bör tas från ett angivet ställe och förvaras under lämpliga förhållanden. I slutet av testperioden tas blodprov strax före eller som ett led i avlivningsförfarandet.

Blodprov, omfattande hematokrit, hemoglobinkoncentration, räkning av röda blodkroppar, total- och differentialräkning av vita blodkroppar, blodplättsräkning samt mätning av koaguleringstid och koaguleringsförmåga, protrombintid eller tromboplastintid tas vid testets början och därefter varje månad eller när halva testperioden gått, och när testet avslutas.

Kliniska biokemiska bestämningar för undersökning av betydande toxiska verkningar i vävnader, särskilt verkningar på njurar och lever, görs på blodprov som tagits från alla djur när testets inleds, varje månad eller när halva testperioden har gått, och när testet avslutas. Undersökning kan även övervägas i fråga om elektrolytbalans, kolhydratmetabolism samt lever- och njurfunktion. De specifika undersökningar som väljs beror på observationerna av hur testämnet agerar. Innan blodprov tas bör djuren fasta under en för arten lämplig period. Till de bestämningar som föreslås hör mätningar av kalcium, fosfor, klorid, natrium, kalium, fasteglukos, alaninaminotransferas, aspartataminotransferas, ornitindekarboxylas, gammaglutamyltranspep-tidas, urinämneskväve, albumin, blodkreatinin, totalbilirubin och totalserumprotein.

Urinanalyser bör göras minst när testet inleds, när halva testperioden gått och när testet avslutas, med uppsamling av urin på fasta tider. Urinanalyserna omfattar utseende, volym, osmolalitet eller specifik vikt, pH, protein, glukos och blod eller blodceller. Ytterligare parametrar kan vid behov användas för att utvidga undersökningen av observerade verkningar.

Dessutom bör undersökning av markörer för allmänna vävnadsskador övervägas. För en tillräcklig toxikologisk bedömning kan även behövas analys av lipider, hormoner, syra-basbalans, metahemoglobin och kolinesterasinhibition. Ytterligare klinisk biokemi kan vid behov användas för att utvidga undersökningen av observerade verkningar. Dessa bestämningar behövs för kemikalier inom vissa klasser eller från fall till fall.

Överlag krävs en viss flexibilitet i fråga om tillvägagångssätt, beroende på djurart och på de observerade eller förväntade verkningarna av ett givet ämne.

1.5.5.3 *Obduktion*

Alla försöksdjur bör genomgå en fullständig obduktion som omfattar omsorgsfull yttre granskning av kroppen, alla kroppsöppningar samt kranium, bröst- och bukhåla och deras innehåll. Lever med gallblåsa, njurar, binjurar, testiklar, bitestiklar, äggstockar, livmoder, sköldkörtel (med bisköldkörtlar), bräss, mjälte, hjärna och hjärta från alla djur (med undantag för de djur som hittas döende eller avlivas under testets gång) putsas från angränsande vävnad och deras våtvikt bestäms så snart som möjligt efter dissekering för att undvika uttorkning.

▼B

Följande vävnader och organ bör bevaras i det mest lämpade mediet med hänsyn till typen av vävnad och planerade efterföljande histopatologiska undersökningar: alla organ och vävnader med stora skador, hjärnan (representativa regioner inbegripet storhjärna, lillhjärna och hjärnbrygga), ryggrad (på tre nivåer: cervikal, thorakal (mellersta) och lumbal), hypofys, ögon, sköldkörtel, bisköldkörtel, bräss, matstrupe, salivkörtlar, magsäck, tunntarm och tjocktarm (inklusive Peyers plack), lever, gallblåsa, bukspottkörtel, njurar, binjurar, mjälte, hjärta, luftstrupe och lungor, aorta, könskörtlar, livmoder, accessoriska könsorgan, honornas bröstkörtlar, prostata, urinblåsa, lymfkörtlar (helst en lymfkörtel som omfattar tillförselvägen och en annan långt från tillförselvägen för att täcka systematiska effekter), perifer nerv (ischias- eller tibialnerven), helst nära muskeln, ett snitt av ryggmärgen (alternativt färskt benmärgsaspirat) och hud. Kliniska eller övriga fynd kan indikera att ytterligare vävnader behöver undersökas. Dessutom bör man bevara alla organ som på grund av testämnets kända egenskaper förmodas vara målorgan.

1.5.5.4 *Histopatologi*

En fullständig histopatologisk undersökning bör utföras på bevarade organ och vävnader från åtminstone alla djur i kontroll- och högdosgruppen. Undersökningarna bör utsträckas till djur i alla andra dosgrupper om behandlingsrelaterade förändringar observeras i högdosgruppen.

Alla stora skador bör undersökas.

Om en satellitgrupp används bör histopatologisk undersökning utföras på de vävnader och organ på vilka verkningar har konstaterats i dosgrupperna.

2. DATA OCH RAPPORTERING

2.1 DATA

Uppgifter bör rapporteras individuellt. Därutöver bör alla uppgifter sammanställas i en tabell över antalet djur i varje testgrupp vid testets början, antalet djur som hittats döda under testet eller som avlivats av humanitära skäl samt tidpunkten för avlivning, antalet djur som uppvisat tecken som tyder på att testämnet är toxiskt, en beskrivning av observerade tecken på toxicitet, inbegripet tidpunkten då sådana första gången upptäcktes, varaktighet och hur allvarliga de toxiska verkningarna är, antalet djur som har skador, typ av skada och procentandelen djur för varje typ av skada.

Om möjligt bör numeriska resultat utvärderas genom en tillämplig och allmänt godtagbar statistisk metod. De statistiska metoderna och data för vilka analys planeras bör väljas när testet utformas.

2.2 TESTRAPPORT

Testrapporten ska innehålla nedan angivna uppgifter.

▼B

2.2.1 **Testämne**

— Aggregationstillstånd, renhet och fysikalisk-kemiska egenskaper.

— Identifieringsdata.

— Vehikel (i förekommande fall). Motivering för val av vehikel, om annan än vatten.

2.2.2 **Försöksdjur**

— Art och stam som använts.

— Djurens antal, ålder och kön.

— Ursprung, förvaringsförhållanden, foder osv.

— Djurens individuella vikter vid testets början.

2.2.3 **Testförhållanden**

— Motivering för val av dosnivåer.

— Utförliga uppgifter om testämnets formulering och beredning av fodret, uppnådd koncentration, prepa ratets stabilitet och homogenitet.

— Utförliga uppgifter om hur testämnet har tillförts.

— Faktiska doser (mg per kg kroppsvikt och dag) och omräkningsfaktor från testämneskoncentrationen i foder eller vatten (ppm) till faktisk dos, om tillämpligt.

— Uppgifter om foder- och vattenkvalitet.

2.2.4 **Resultat**

— Kroppsvikt och förändringar av kroppsvikt.

— Foderkonsumtion och i tillämpliga fall vattenkonsumtion.

— Uppgifter om toxiska reaktioner per kön och dosnivå, inklusive tecken på toxicitet.

— Art, grad och varaktighet för kliniska observationer (oavsett om de är reversibla eller inte).

— Oftalmologisk undersökning.

— Blodundersökningar med relevanta basvärden.

— Kliniska biokemiska undersökningar med relevanta basvärden.

— Kroppsvikt vid avlivning, organvikt och förhållandena mellan organ- och kroppsvikt.

— Obduktionsfynd.

— En detaljerad beskrivning av alla histopatologiska fynd.

— Absorptionsdata om de finns tillgängliga.

— Statistisk bearbetning av resultaten, i tillämpliga fall.

Diskussion om resultaten.

Slutsatser.

▼B

B.28 **TEST AVSEENDE SUBKRONISK DERMAL TOXICITET 90 DAGARS REPETERAD DERMALTEST PÅ GNAGARE**

1. **METOD**

1.1 INLEDNING

Se allmän inledning till del B.

1.2 DEFINITIONER

Se allmän inledning till del B.

1.3 REFERENSÄMNEN

Inga.

1.4 TESTMETODSPRINCIP

Testämnet appliceras dagligen på huden i graderade doser till flera grupper av försöksdjur, en bestämd dos per grupp i 90 dagar. Under försöksperioden ska djuren observeras dagligen för tecken på toxicitet. Djur som dör under försöket obduceras och i slutet av försöket avlivas och obduceras överlevande djur,

1.5 KVALITETSKRITERIER

Inga.

1.6 METODBESKRIVNING

Förberedelser

I minst fem dagar före försöket ska djuren hållas under testbetingelserna vad beträffar miljö och utfodring. Före försöket fördelas unga friska djur slumpmässigt i behandlings- och kontrollgrupper. Kort innan försöket klipps ryggpälsen bort på försöksdjuren. Om pälsen rakas bort bör detta ske ca 24 timmar innan försöket inleds. Klippning och rakning måste normalt upprepas varje vecka. Vid klippning eller rakning ska försiktighet iakttas så att huden inte skadas. Minst 10 % av djurets kroppsyta ska göras klar för applicering av testämnet. Djurets vikt måste beaktas vid bestämning av hur stort område som ska klippas. Vid test av fasta ämnen, vilka vid behov kan pulveriseras, ska testämnet fuktas tillräckligt med vatten eller, vid behov, med lämplig vehikel, för att säkerställa god kontakt med huden. Flytande testämnen används vanligen outspädda. Daglig applicering fem till sju dagar i veckan ska ske.

Försöksbetingelser

F ö r s ö k s d j u r

Vuxna råttor eller kaniner får användas. Andra djurarter kan användas men detta måste motiveras. Djur av vanligen nyttjade laboratoriestammar ska användas. Vid inledning av försöket får vikten hos de djur som används inte avvika mer än ± 20 % från genomsnittsvikten. Om ett test av subkronisk toxicitet med dermal tillförsel utförs som en förundersökning till en långtidsundersökning ska samma djurart och stam användas i båda undersökningarna.

▼B

Antal och kön

Minst 20 djur (10 hondjur och 10 handjur) med frisk hud ska användas på varje doseringsnivå. Hondjuren får inte ha fött ungar och får inte vara dräktiga. Vid planenligt avlivande av försöksdjur under försöket ska det ursprungliga antalet djur ökas med det antal djur som planenligt ska avlivas innan försöket slutförs. Dessutom kan en satellitgrupp bestående av 20 djur (10 av vardera kön) behandlas med den högsta dosen i 90 dagar och därefter observeras i 28 dagar för reversibilitet, per-sistens eller fördröjt uppträdande av toxiska verkningar.

Dosnivåer

Minst tre dosnivågrupper och en kontrollgrupp ska användas. Om vehikel används ska, förutom kontrollgruppen, en vehikelkontrollgrupp användas. Exponeringsperioden bör vara minst sex timmar per dag. Applicering av testämnet bör ske vid samma tidpunkt varje dag och den mängd ämne som används ska justeras regelbundet (varje eller varannan vecka) för att säkerställa att den hålls konstant i förhållande till djurets kroppsvikt. Djuren i kontrollgrupen ska behandlas på samma sätt som försöksdjuren, bortsett från applicering av testämnet. Om vehikel används för att underlätta doseringen ska vehikelkontrollgruppen doseras på samma sätt som försöksgrupperna och ges samma mängd ämne som den som appliceras på djuren i den försöksgrupp med den högsta doseringsnivån. Den högsta doseringsnivån bör medföra toxiska verkningar men inte leda till någon, eller endast begränsad, dödlighet. Den lägsta doseringsninvån bör inte ha någon toxisk verkan. Om det finns en användbar uppskattning av människors högsta exponering för ämnet bör den lägsta dosnivån vara högre än denna. Idealt ska medeldosen medföra minsta möjliga observerbara toxiska verkningar. Om flera medeldosnivåer används ska de väljas på ett sätt att en gradering av de toxiska verkningarna, erhålls. I lågdos-, medeldos- och kontrollgrupperna bör antalet dödsfall vara få för att möjliggöra en meningsfull utvärdering av resultaten.

Om testämnet medför allvarlig hudirritation bör koncentrationen sänkas, vilket kan leda till en minskning eller ett fullständigt bortfall av de övriga toxiska verkningarna vid den högsta doseringsnivån. Om huden har skadats allvarligt kan det vara nödvändigt att avbryta försöket och utföra ett nytt försök med en lägre koncentration.

Gränstest

Om en dos av 1 000 mg/kg kroppsvikt och dag eller en högre dosnivå som fastställts på grundval av kännedom om exponering för människor, inte medför någon toxisk verkan kan ytterligare testning anses överflödig.

Observationsperiod

Samtliga djur ska observeras dagligen och tecken på toxicitet registreras. Tidpunkten för dödsfall och tidpunkten vid vilken tecken på toxicitet uppträder respektive försvinner ska registreras.

▼B

F ö r f a r a n d e

Djuren ska hållas i var sin bur. Idealt appliceras testämnet varje dag i 90 dagar.

Djur i en eventuell satellitgrupp som planerats för uppföljning bör hållas under observation i ytterligare 28 dagar utan applicering av testämne för att fastställa om de toxiska verkningarna försvinner eller håller i sig. Exponeringsperioden bör vara sex timmar per dag.

Testämnet ska appliceras jämnt över ett område som motsvarar ca 10 % av den totala kroppsytan. Vid användning av kraftigt toxiska ämnen kan en mindre yta täckas, men ämnet ska appliceras på ytan i ett så tunt och jämnt lager som möjligt.

Testämnet hållas i kontakt med huden med en porös gaskompress och icke hudirriterande tejp. Testytan ska vidare täckas på lämpligt sätt för att säkerställa att gaskompressen och testämnet hålls på plats och att djuren inte kan svälja testämnet. För att förhindra att djuren intar testämnet kan rörelsehindrande anordningar användas, men total immobilisering rekommenderas inte.

I slutet av exponeringsperiodens ska resterande testämne avlägsnas, i lämpliga fall med vatten eller med annan lämplig metod för rengöring av huden.

Samtliga djur ska observeras dagligen och tecken på toxicitet ska registreras tillsammans med tidpunkten då de uppträdde för första gången samt graden och varaktigheten av toxiciteten. Observationer av djuren i burarna ska omfatta hud- och pälsförändringar, ögon, slemhinnor, respirations-och cirkulationssystem, autonoma och centrala nervsystemet, kroppsmotorik samt beteendemönster. Foderintag och djurens vikt ska registreras en gång i veckan. Det är nödvändigt att observera djuren regelbundet för att säkerställa att så få djur som möjligt faller bort från studien till följd av kannibalism, autolys av vävnader eller förväxling. I slutet av testperioden avlivas och obduceras alla överlevande djur, utom djuren i satellitgruppen. Så snart döende djur upptäcks ska dessa avlägsnas, avlivas och obduceras.

Följande undersökningar utförs normalt på alla djur, inbegripet kontrollgruppen:

a) Innan testämnet appliceras samt sedan försöket avslutats utförs en oftamologisk undersökning med användning av ett oftalmoskop eller liknande lämplig utrustning, helst på alla djur men åtminstone på djuren i högdos- och kontrollgrupperna. Om förändringar i ögonen observeras ska alla djur undersökas.

b) Vid slutet av testperioden ska en hematologisk undersökning utföras, inbegripet hematokrit-och hemoglobinkoncentration, erytrocyträkning, total och differentiell leukocyträkning, mätning av koagulationsnivån, t.ex. koagulationstid, protombintid, tromboplastintid eller blodplättsräkning.

▼B

c) Vid slutet av försöksperioden ska en klinisk-biokemisk blod analys utföras. För denna undersökning är följande analysområden lämpliga: elektrolytbalans, kolhydratmetabolism, lever- och njurfunktion. Valet av specifika analyser kommer att påverkas av observationer av testämnets verkningssätt. Följande bestämningar föreslås: kalcium, fosfor, klorid, natrium, kalium, fasteglukos (fasteperioden beror på djurarten), glutaminsyra-pyrodruvsyra-transaminas ([1]), glutamin-syra-oxalättiksyra-transaminas ([2]), ornitin dekarboxylas, gamma-glutamyl-transpeptidas, urinkväve, albumin, blodkreatinin, totalt bilirubin och totalt serumprotein. Andra bestämningar som kan vara nödvändiga för en tillfredsställande toxikologisk bedömning inbegriper analyser av lipider, hormoner, syra/basbalans, methemoglobin och kolinesterasaktivitet. Ytterligare klinisk-biokemiska analyser kan utföras då sådana behövs för en vidare undersökning av observerade verkningar.

d) En urinanalys krävs i regel inte, men kan dock vara nödvändig om en toxisk verkan förväntas eller observeras.

Om tidigare insamlade basdata är otillräckliga bör man överväga att bestämma hematologiska och klinisk-biokemiska parametrar innan man inleder försöket.

Makroskopisk undersökning

Alla djur bör underkastas en fullständig obduktion som inbegriper undersökning av alla externa kroppsytor, alla kroppsöppningar liksom kranie-, bröstkorgs- och bukhålan samt deras innehåll. Lever, njurar, binjurar och testiklar ska vägas våta så snart som möjligt efter dissektion för att undgå uttorkning. Följande vävnader och organ bör bevaras i ett lämpligt medium för en eventuell framtida histopatologisk undersökning: alla vävnader och organ som uppvisar lesioner, hjärnan –inbegripet snitt av medulla/pons, lillhjärnbarken och hjärnbarken, hypofysen, sköldkörteln/bisköldkörteln, thymusvävnad, (luftstrupe) och lungor, hjärta, stora kroppspulsådern, spottkörtlar, lever, mjälte, njurar, binjurar, bukspottskörtel, könskörtlar, livmoder, associerade könsorgan, gallblåsa (om sådan finns), matstrupe, magsäck, tolvfingertarm, tomtarmen, ileum, cekum, colon, ändtarm, urinblåsan, representativa lymfkörtlar, (kvinnliga bröstkörtlar), (lårmuskulatur), nerver från det perifera nervsystemet, (bröstbenet med benmärg), (ögon), (femur, inbegripet ledyta), (ryggmärg på tre nivåer – vid halsen, mitt för bröstkorgen och från landområdet), och (exorbitala tårkörtlar). De vävnader som anges inom parentes behöver endast undersökas om det finns tecken på toxicitet eller i samband med målorgan.

Histopatologisk undersökning

a) En fullständig histopatologisk undersökning ska utföras på obehandlad och behandlad hud och på organ och vävnader från alla djur i kontroll- och högdosegrupperna.

b) Alla allvarliga lesioner ska undersökas.

([1]) Numera känt som serum alanine aminotransferase.
([2]) Numera kant som serum aspartate aminotransferase.

▼B

c) Målorgan i andra dosgrupper ska också undersökas.

d) Om råttor används ska lungorna från djur i låg- och medeldosgrupperna undersökas histopatologiskt för tecken på infektion, eftersom detta ger en lämplig uppfattning om djurens hälsotillstånd. Ytterligare histopatologiska undersökningar av djur i dessa grupper krävs inte rutinmässigt, men organ som har uppvisat tecken på lesioner i högdosgruppen ska alltid undersökas.

e) Djur i en eventuell satellitgrupp bör underkastas en histopatologisk undersökning av de organ och vävnader som har visat tecken på toxisk verkan hos djur i de behandlade grupperna.

2. **DATA**

Data ska ställas upp i tabellform och för varje grupp ska anges antal djur i början av försöket, antal djur med lesioner och den procent djur som uppvisar varje slag av lesion. Resultaten ska utvärderas på grundval av en lämplig statistisk metod. Alla erkända statistiska metoder får användas.

3. **RAPPORTERING**

3.1. TESTRAPPORT

Testrapporten ska om möjligt innehålla följande:

— Djurart, stam, härkomst, miljöbetingelser, foder.

— Försöksbetingelser.

— Dosnivåer (med angivande av vehikel om sådan använts) och koncentrationer.

— Upplysningar om toxisk reaktion uppdelade efter kön och dos.

— Icke-toxisk dos, om sådan har fastställts.

— Tidpunkten för dödsfall under försöket eller överlevnad till slutet av försöket.

— Beskrivning av toxiska och andra verkningar.

— Tidpunkt för observation av varje abnormalt tecken och dess senare utveckling.

— Uppgifter om foder och kroppsvikt.

— Oftamologiska rön.

— Hematologiska undersökningar och samtliga resultat.

— Använda klinisk-biokemiska undersökningar och samtliga resultat (inbegripet resultat av en eventuell urinanalys).

— Obduktionsrön.

▼B

— Detaljerad beskrivning av alla histopatologiska rön.

— Eventuell statistisk bearbetning av resultaten.

— Diskussion av resultaten.

— Tolkning av resultaten.

3.2. UTVÄRDERING OCH TOLKNING

Se den allmänna inledningen till del B.

4. **HÄNVISNINGAR**

Se den allmänna inledningen till del B.

▼M4

B.29 **SUBKRONISK INHALATIONSTOXICITET: 90-DAGARSSTUDIE**

SAMMANFATTNING

Denna reviderade B.29-testmetod har utformats för att till fullo karakterisera testkemikaliens inhalationstoxicitet under en begränsad tidsperiod (90 dagar), och för att tillhandahålla stabila data för kvantitativa riskbedömningar. Grupper om 10 hangnagare och 10 hongnagare exponeras 6 timmar per dag under en 90-dagarsperiod (13 veckor) för a) testkemikalien vid tre eller fler koncentrationsnivåer, b) filtrerad luft (negativ kontroll, och/eller c) vehikeln (vehikelkontroll). Djur exponeras i allmänhet 5 dagar per vecka, men exponering 7 dagar per vecka är också tillåten. Hanar och honor testas alltid, men de kan exponeras vid olika koncentrationsnivåer om det är känt att ett kön är mer mottagligt för en viss testkemikalie. Denna metod ger försöksledaren flexibilitet att inkludera satellitgrupper (reversibilitet), avlivningar, lungsköljning (BAL), neurologiska tester och ytterligare utvärderingar av klinisk patologi och histopatologi för att bättre kunna karakterisera en testkemikalies toxicitet.

INLEDNING

1. Den här testmetoden motsvarar OECD:s testriktlinje 413 (2009). Den ursprungliga testriktlinjen 413 (TG 413) för subkronisk inhalation antogs 1981 (1). Den här testmetoden B.29 (som motsvarar den reviderade testriktlinjen 413 (2009)) har uppdaterats för att återspegla vetenskapen och möta nuvarande och framtida lagstiftningsbehov.

2. Studier av subkronisk inhalationstoxicitet används främst för att härleda regulatoriska koncentrationer för bedömning av risker i arbetsmiljöer. De används också för att bedöma människors bostäder, transportmedel och miljörisker. Den här testmetoden medger karakterisering av negativa effekter efter upprepad daglig exponering genom inhalation av en testkemikalie under 90 dagar (cirka 10 % av en råttas livslängd). Datan som härrör från studier om subkronisk inhalationstoxicitet kan användas för kvantitativa riskbedömningar och för valet av koncentrationer för kroniska studier. Den här testmetoden är inte specifikt avsedd för testning av nanomaterial. Definitioner som används inom ramen för den här metoden finns i slutet av det här kapitlet och i vägledningsdokumentet (GD) 39 (2).

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN

3. All tillgänglig information om testkemikalien bör beaktas av laboratoriet innan studien genomförs i syfte att höja studiens kvalitet och minimera djuranvändningen. Information som underlättar valet av lämpliga testkoncentrationer kan inkludera identitet, kemisk struktur, och fysikalisk-kemiska egenskaper hos testkemikalien, resultat från eventuella in vitro- eller in vivo-toxicitetstester, förväntad användning(ar) och risken för mänsklig exponering, tillgängliga (Q)SAR-data och toxikologiska data om strukturellt närbesläktade kemikalier samt data från andra studier av upprepad exponering. Om neurotoxicitet förväntas eller observeras under studiens gång, kan försöksledaren välja att inkludera lämpliga utvärderingar såsom en funktionell samlingsstudie (FOB) och mätning av motorisk aktivitet. Även om tidpunkter för exponeringar i förhållande till specifika undersökningar kan vara kritiska, bör resultaten från dessa extra aktiviteter inte störa studiens grundläggande utformning.

▼M4

4. Utspädningar av korrosiva eller irriterande testkemikalier kan testas vid koncentrationer som kommer att ge den önskade graden av toxicitet. För ytterligare information se GD 39 (2). När djur utsätts för dessa material bör målkoncentrationerna vara tillräckligt låga för att inte orsaka avsevärd smärta och lidande, men ändå tillräckliga för att utsträcka koncentration-respons-kurvan till nivåer som gör att testets regulatoriska och vetenskapliga mål kan uppnås. Dessa koncentrationer bör väljas från fall till fall, företrädesvis baserade på en adekvat utformad undersökning av spännvidden som ger information om den kritiska endpointen, eventuellt tröskelvärde för irritation och tiden för de första tecknen (se punkterna 11–13). Motivering för valet av koncentration ska anges.

5. Döende djur eller djur som visar tecken på uppenbar smärta eller svårt och ihållande lidande ska avlivas skonsamt. Döende djur betraktas på samma sätt som de som dör under testet. Kriterier för att ta beslutet att avliva döende eller svårt lidande djur, och vägledning om hur man känner igen tecken på förutsägbar eller annalkande död, omfattas i OECD:s vägledningsdokument om humana endpoints (3).

METODBESKRIVNING

Val av djurart

6. I testet bör friska unga vuxna gnagare användas av stammar som vanligtvis används på laboratorier. För detta test används råtta. Motivering ska ges om annan art används.

Förberedelse av djuren

7. Honorna ska inte ha fått ungar och inte vara dräktiga. På dagen för randomiseringen bör djuren vara unga vuxna 7 till 9 veckor gamla. Kroppsvikten bör ligga inom ± 20 % av medelvikten för vardera könet. Djuren väljs ut slumpvis och märks för individuell identifikation, och får därefter acklimatisera sig till laboratoriets betingelser i sina burar i minst fem dagar före teststarten.

Djurhållning

8. Djuren bör identifieras individuellt, företrädesvis med subkutana transpondrar för att underlätta observationer och undvika förvirring. Temperaturen i försöksdjurens utrymmen bör vara 22 ± 3 °C. Den relativa fuktigheten bör ligga mellan 30 och 70 %, även om detta kanske inte är möjligt när vatten används som vehikel. Före och efter exponeringen bör djuren inhysas i grupper avhängigt kön och koncentration, dock får antalet djur per bur inte hindra en tydlig observation av varje enskilt djur, och förluster genom kannibalism och slagsmål bör minimeras. Om endast djurens nosar ska exponeras kan det vara nödvändigt att de får acklimatisera sig till fasthållningsrören. Fasthållningsrören ska inte medföra onödig fysisk, termisk eller fasthållningsstress för djuren. Fasthållning kan påverka fysiologiska endpoints såsom kroppstemperatur (hypotermi) och/eller minimala respiratoriska volymer. Om det finns generiska data tillgängliga som inte pekar på sådana förändringar i någon nämnvärd omfattning är det inte nödvändigt med anpassningen till rören före exponeringen. Djur vars hela kroppar ska exponeras för en aerosol ska inhysas individuellt under exponeringen för att förhindra att de andra djuren i buren filtrerar aerosolen genom sina pälsar. För utfodringen kan konventionellt laboratoriefoder användas, utom under exponeringen, tillsammans med en obegränsad tillgång till vatten. Belysningen bör vara artificiell med omväxlande 12 timmar ljus och 12 timmar mörker.

▼M4

Inhalationskammare

9. Vid val av inhalationskammare bör man beakta kemikaliens beskaffenhet och ändamålet med testet. Det föredragna exponeringssättet är enbart nos (termen inkluderar även enbart huvud, enbart nos eller enbart tryne). Exponering av enbart nos föredras i allmänhet vid studier av vätskor och fasta aerosoler och ånga som kan kondenseras och bilda aerosoler. Vissa av undersökningens mål kan bättre uppnås genom exponering av hela kroppen, men detta ska motiveras i undersökningsrapporten. För att säkerställa atmosfärisk stabilitet vid användningen av en helkroppskammare ska den totala volymen av försöksdjuren inte överskrida 5 % av kammarens volym. Teknikerna för enbart nos och helkroppsexponeringens principer och särskilda för- och nackdelar behandlas i GD 39 (2).

TOXICITETSSTUDIER

Koncentrationsgränser

10. Till skillnad från akuta studier finns det inga fastställda koncentrationsgränser i studier av subkronisk inhalationstoxicitet. För den högsta testade koncentrationen bör man beakta: 1) högsta möjliga koncentration, 2) värsta tänkbara fall av mänsklig exponering, 3) behovet av att ge en tillräcklig syretillförsel och/eller 4) djurskyddsskäl. I avsaknad av databaserade gränsvärden, får de akuta gränsvärdena i förordning (EG) nr 1272/2008 (13) användas (dvs. upp till en högsta koncentration av 5 mg/l för aerosoler, 20 mg/l för ångor och 20 000 ppm för gaser); se GD 39 (2). Motivering ska ges om det är nödvändigt att överskrida dessa gränsvärden vid testning av gaser eller mycket flyktiga testkemikalier (t.ex. köldmedier). Koncentrationsgränsen bör framkalla tydlig toxicitet utan att utsätta djuren för onödig stress eller påverka deras livslängd (3).

Spännviddsstudie

11. Innan huvudstudien påbörjas är det i allmänhet nödvändigt att genomföra en spännviddsstudie. En spännviddsstudie är mer omfattande än en inledande studie eftersom den inte är begränsad till valet av koncentration. Kunskap från en spännviddsstudie kan leda till en lyckad huvudstudie. En spännviddsstudie kan till exempel ge teknisk information om analysmetoder, partikeldimensionering, upptäckt av toxiska mekanismer, klinisk patologi- och histopatologidata, och en uppskattning av vad som kan vara NOAEL- och MTC-koncentrationer i en huvudstudie. Försöksledaren kan välja att använda en spännviddsstudie för att identifiera tröskelvärdet för irritation i luftvägarna (t.ex. med histopatologi i luftvägarna, lungfunktionstest eller lungsköljning), den övre koncentration som tolereras utan att djuren utsätts för onödig stress och de parametrar som bäst kännetecknar en testkemikalies toxicitet.

12. En spännviddsstudie kan bestå av en eller flera koncentrationsnivåer. Beroende på de endpoints som valts bör 3 till 6 hanar och 3 till 6 honor exponeras vid varje koncentrationsnivå. En spännviddsstudie ska pågå under minst 5 dagar och vanligtvis inte mer än i 28 dagar. Motiveringen för valet av koncentrationer till huvudstudien ska ges i undersökningsrapporten. Syftet med huvudstudien är att påvisa ett koncentration-respons-förhållande baserat på vad som förväntas vara den mest känsliga endpointen. Den låga koncentrationen bör helst vara en koncentration utan en påvisbar skadlig effekt medan den höga koncentrationen bör framkalla tydlig toxicitet utan att utsätta djuren för onödig stress eller påverka deras livslängd (3).

▼M4

13. Vid valet av koncentrationsnivåer för spännviddsstudien bör all tillgänglig information beaktas, inklusive struktur-aktivitetsförhållanden samt data för liknande kemikalier (se punkt 3). En spännviddsstudie kan verifiera/motbevisa vad som anses vara de endpoints som är mest mekanistiskt baserade, t.ex. kolinesterasinhibition av organiska fosforföreningar, methemoglobinbildning av erytrocytotoxiska agens, sköldkörtelhormoner (T_3, T_4) för tyreotoxiska ämnen, protein, LDH eller neutrofiler i bronkoalvelvolär sköljning för ofarliga svårlösliga partiklar eller lungretande aerosoler.

Huvudstudie

14. Huvudstudien för subkronisk toxicitet består i allmänhet av tre koncentrationsnivåer och även samtidiga negativa (luft) och/eller vehikelkontroller efter behov (se punkt 18). Alla tillgängliga data bör användas för att underlätta valet av lämpliga exponeringsnivåer, inklusive resultaten från de systematiska toxicitetsstudierna, metabolism och kinetik (särskild vikt bör läggas vid att undvika höga koncentrationsnivåer som mättar kinetiska processer). Varje testgrupp består av 10 hangnagare och 10 hongnagare som exponeras för testkemikalien 6 timmar per dag 5 dagar per vecka under en period på 13 veckor (total studielängd minst 90 dagar). Djuren kan också exponeras 7 dagar per vecka (t.ex. vid testning av läkemedel som inhaleras. Om ett kön är känt för att vara mer mottagligt för en viss testkemikalie kan könen exponeras vid olika koncentrationsnivåer för att optimera koncentrationsresponsen enligt beskrivningen i punkt 15. Om andra gnagare än råttor exponeras enbart nos, får maximala exponeringstider justeras för att minska artspecifikt lidande. En motivering bör ges när man använder kortare exponeringstid än 6 timmar/dag, eller när det är nödvändigt att utföra en helkroppsexponeringsstudie med lång varaktighet (t.ex. 22 timmar/dag) (se GD 39) (2). Inget foder ska ges under exponeringsperioden, om den inte överskrider 6 timmar. Vatten kan tillhandahållas under en helkroppsexponering.

15. Den målkoncentration som valts ska identifiera målorgan(en) och påvisa en tydlig koncentrationsrespons:

— Den höga koncentrationsnivån bör leda till toxiska effekter, men inte orsaka kvardröjande tecken eller dödlighet, vilket kan förhindra en meningsfull utvärdering.

— Den mellanliggande koncentrationsnivån(erna) bör spridas ut för gradering av toxiska effekter mellan den låga och höga koncentrationen.

— Den låga koncentrationsnivån bör frambringa få eller inga belägg för toxicitet.

Avlivande

16. Om avlivning planeras ska antalet djur vid varje exponeringsnivå ökas med det antal som ska avlivas före studiens avslutande. Motiveringen för att använda avlivningar bör tillhandahållas samt statistiska analyser som stöder dem.

▼M4

Satellitstudie (reversibilitet)

17. En satellitstudie (reversibilitet) kan användas för att observera reversibilitet, persistens eller fördröjd toxicitet för en efterbehandlingsperiod av lämplig längd, dock inte mindre än 14 dagar. Satellitgrupper (reversibilitet) består av 10 hanar och 10 honor som exponeras samtidigt med försöksdjuren i huvudstudien. Satellitstudiegrupper bör exponeras för testkemikalien vid den högsta koncentrationsnivån och det bör finnas samtidiga luft- och/eller vehikelkontroller efter behov (se punkt 18).

Kontrolldjur

18. Samtidiga negativa (luft-) kontrolldjur bör hanteras på ett sätt som är identiskt med djuren i testgruppen, förutom att de exponeras för filtrerad luft i stället för testkemikalien. När vatten eller annat ämne används för att generera testatmosfären bör en vehikelkontrollgrupp i stället för en negativ (luft-) kontrollgrupp ingå i studien. Vatten bör användas som vehikel närhelst det är möjligt. När vatten används som vehikel bör kontrolldjuren exponeras för luft med samma relativa fuktighet som de exponerade grupperna. Valet av en lämplig vehikel bör grunda sig på en lämpligt utförd förstudie eller historiska data. Om en vehikels toxicitet inte är känd kan försöksledaren välja att använda både en negativ (luft-) kontroll och en vehikelkontroll, men det rekommenderas inte. Om historiska data visar att en vehikel inte är toxisk finns det inget behov av en negativ (luft-) kontrollgrupp och då bör endast en vehikelkontroll användas. Om en förstudie av en testkemikalie som beretts i en vehikel inte visar någon toxicitet, framgår det att vehikeln inte är toxisk vid den testade koncentrationen och att denna vehikelkontroll bör användas.

EXPONERINGSBETINGELSER

Administration av koncentrationer

19. Djur exponeras för testkemikalien som en gas, ånga, aerosol eller en blandning av dem. Det fysikaliska tillstånd som ska testas beror på testkemikaliens fysikalisk-kemiska egenskaper, valda koncentrationer och/eller dess mest sannolika fysikaliska form vid hanteringen och användningen. Hygroskopiska och kemiskt reaktiva testkemikalier ska testas i torr luft. Det är viktigt att se till att inga explosiva koncentrationer skapas. För att minska partikelstorleken kan partikelmaterialet utsättas för mekaniska processer. Mer vägledning finns i GD 39 (2).

Partikelstorleksfördelning

20. Partikeldimensionering bör utföras för alla aerosoler och ångor som kan kondenseras och bilda aerosoler. För att möjliggöra exponering av alla relevanta områden i luftvägarna, rekommenderas aerosoler med en aerodynamisk diameter (MMAD) i intervallet 1 till 3 μm med en geometrisk standardavvikelse (σ_g) i intervallet 1,5 till 3,0 (4). Även om en rimlig ansträngning krävs för att uppfylla denna standard, bör en sakkunnig bedömning ges om detta inte kan uppnås. Till exempel blir rökpartiklar av metall mindre än denna standard, och laddade partiklar och fibrer kan överstiga den.

▼M4

Beredning av testkemikalie i en vehikel

21. Testkemikalien ska helst testas utan en vehikel. Om det är nödvändigt att använda en vehikel för att generera en lämplig koncentration och partikelstorlek av testkemikalien, bör vatten ges företräde. Närhelst en testkemikalie är upplöst i en vehikel ska dess stabilitet påvisas.

ÖVERVAKNING AV EXPONERINGSFÖRHÅLLANDEN

Kammarens luftflöde

22. Luftflödet genom exponeringskammaren ska omsorgsfullt kontrolleras, kontinuerligt övervakas och registreras minst en gång i timmen under varje exponering. Övervakningen i realtid av testatmosfärens koncentration (eller temporal stabilitet) är en integrerad mätning av samtliga dynamiska parametrar och ger ett indirekt sätt att kontrollera alla relevanta dynamiska inhalationsparametrar. Om koncentrationen övervakas i realtid kan mätfrekvensen för luftflöden minskas till en enda mätning per exponeringsdag. Särskild hänsyn bör tas för att undvika återandning i enbart nos-kammare. Syrehalten bör vara minst 19 % och koncentrationen av koldioxid bör inte överstiga 1 %. Om det finns anledning att tro att denna standard inte kan uppfyllas bör man mäta koncentrationen av syre och koldioxid. Om mätningar under den första exponeringsdagen visar att dessa gaser har korrekta nivåer behöver inga fler mätningar utföras.

Kammarens temperatur och relativa fuktighet

23. Kammarens temperatur bör upprätthållas vid 22 ± 3 °C. Relativ fuktighet i djurens andningsapparater, för både enbart nos och helkroppsexponering, bör övervakas kontinuerligt och registreras varje timme vid varje exponering, om möjligt. Den relativa fuktigheten bör helst upprätthållas inom intervallet 30 till 70 %, men detta kanske inte är möjligt (t.ex. vid testning av vattenbaserade blandningar), eller inte mätbart på grund av att testkemikalien stör själva testmetoden.

Testkemikalie: Nominell koncentration

24. När det är möjligt bör den nominella koncentrationen i exponeringskammaren beräknas och registreras. Den nominella koncentrationen är massan av den genererade testkemikalien dividerad med den totala volymen av luft som passerade genom inhalationskammarsystemet. Den nominella koncentrationen används inte för att karakterisera djurens exponering, men en jämförelse mellan den nominella koncentrationen och den faktiska koncentrationen ger en indikation på testsystemets genereringsprestanda, och kan därmed användas för att upptäcka genereringsproblem.

Testkemikalie: Faktisk koncentration

25. Den faktiska koncentrationen är testkemikaliekoncentrationen som samlats in i djurets andningsområde i en inhalationskammare. Faktiska koncentrationer kan erhållas antingen genom särskilda metoder (t.ex. direkt provtagning, adsorptiva eller kemiskt reaktiva metoder, och efterföljande analytisk karakterisering) eller genom icke-specifika metoder såsom gravimetrisk filteranalys. Användningen av gravimetrisk analys är endast acceptabel för pulveraerosoler bestående av en enda komponent eller aerosoler bestående av vätskor med låg flyktighet, och bör stödjas av en lämplig preklinisk studie med kemikaliespecifik karakterisering. Koncentrationen i pulveraerosoler bestående av flera komponenter kan också bestämmas genom gravimetrisk analys. Detta kräver dock analysresultat som visar att sammansättningen av

▼M4

luftburet material liknar startmaterialet. Om denna information inte finns tillgänglig kan det vara nödvändigt med en ny analys av testkemikalien (helst i sitt luftburna tillstånd) under loppet av studien. För medel i aerosolform som kan förångas eller sublimeras bör man kunna visa att samtliga faser uppsamlades med den valda metoden.

26. En sats av testkemikalien ska användas genom hela studien, om möjligt, och provet ska lagras under sådana förhållanden att det bibehåller sin renhet, homogenitet och stabilitet. Inför starten av studien bör det finnas en beskrivning av testkemikalien som inbegriper dess renhet och, om det är tekniskt genomförbart, identitet, och kvantiteterna av identifierade föroreningar och orenheter. Detta kan visas genom, men är inte begränsat till, följande data: retentionstid och relativ topparea, molekylvikt från masspektroskopi eller gaskromatografianalys, eller andra uppskattningar. Även om testlaboratoriet inte ansvarar för provets identitet, kan det vara klokt att man i stora drag bekräftar karakteriseringen (t.ex. färg, fysisk natur etc.).

27. Exponeringsatmosfären ska hållas så konstant som möjligt. En enhet för realtidsövervakning, såsom en aerosolfotometer för aerosoler eller en analysator för totalkolväte för ångor kan användas för att påvisa stabiliteten för exponeringsförhållandena. Faktisk kammarkoncentration bör mätas minst 3 gånger varje exponeringsdag vid varje exponeringsnivå. Om det inte är möjligt på grund av begränsade luftflöden eller låga koncentrationer, är det acceptabelt med ett prov per exponeringsperiod. Helst ska detta prov sedan samlas in under hela exponeringsperioden. Provtagning av kammarkoncentrationer från individuella kammare bör inte avvika från den genomsnittliga koncentrationen med mer än ± 10 % för gaser och ångor, och inte med mer än ± 20 % för flytande eller fasta aerosoler. Tid för att uppnå kammarjämvikt (t_{95}) bör beräknas och rapporteras. Varaktigheten för en exponering sträcker sig över den tid som testkemikalien genereras. Detta tar hänsyn till den tid som krävs för att uppnå kammarens jämvikt (t_{95}) och sönderfall. Riktlinjer för att uppskatta t_{95} finns i GD 39 (2).

28. För mycket komplexa blandningar bestående av gaser/ångor och aerosoler (t.ex. förbränningsatmosfärer och testkemikalier framdrivna från därför avsedd slutanvändningsprodukt/-utrustning) kan varje fas bete sig olika i en inhalationskammare. Därför ska minst ett indikatorämne väljas (analyt), vanligtvis den huvudsakliga aktiva ingrediensen i blandningen för varje fas (gas/ånga och aerosol). När testkemikalien är en blandning ska den analytiska koncentrationen i totalblandningen rapporteras, inte bara den aktiva ingrediensen eller indikatorämnet (analyten). Ytterligare information om faktisk koncentration finns i GD 39 (2).

Testkemikalie: Partikelstorleksfördelning

29. Aerosolers partikelstorleksfördelning bör fastställas minst en gång i veckan vid varje koncentrationsnivå med hjälp av en kaskadimpaktor eller ett alternativt instrument såsom en aerodynamisk partikelsorterare APS). Om man kan visa ett likvärdigt resultat från en kaskadimpaktor och det alternativa instrumentet, kan man använda det sistnämnda under hela studien.

▼M4

30. En andra enhet, till exempel ett gravimetriskt filter eller en impinger/gasbubblare, bör användas parallellt med det primära instrumentet för att bekräfta uppsamlingsprestandan hos det primära instrumentet. Masskoncentrationen som erhållits genom analys av partikelstorleken ska ligga inom rimliga gränser för den masskoncentration som erhållits genom filteranalys (se GD 39 (2)). Om likvärdigheten kan påvisas för alla koncentrationer som testats i ett tidigt skede av försöket, kan ytterligare bekräftande mätningar utelämnas. Av hänsyn till djurskyddsskäl bör åtgärder vidtas för att minimera ofullständiga uppgifter som kan leda till att studien måste upprepas.

31. Partikeldimensionering bör utföras för ångor om det finns en möjlighet att kondensen kan bilda en aerosol, eller om partiklar upptäcks i ångatmosfären som kan göra så att faserna blandas.

IAKTTAGELSER

32. Djuren bör observeras kliniskt före, under och efter exponeringsperioden. Mer frekventa iakttagelser kan indikeras beroende på djurens respons under exponeringen. När iakttagelser av djuren hindras genom användning av fasthållningsrör, dåligt upplysta kroppskammare eller ogenomskinlig atmosfär, bör djuren noga observeras efter exponeringen. Observationer före nästa dags exponering kan utvärdera eventuell reversibilitet eller stegrande toxiska effekter.

33. Alla observationer registreras med individuell registrering för varje djur. När djur avlivas av humanitära skäl eller påträffas döda, ska tidpunkten för dödsfallet registreras så noggrant som möjligt.

34. Observationer vid buren bör omfatta förändringar i hud och päls, ögon och slemhinnor, förändringar i andnings- och cirkulationssystemen, förändringar i nervsystemet, samt förändringar i kroppsmotorik och beteendemönster. Uppmärksamhet bör fästas vid iakttagelser av tremor, konvulsioner, salivutsöndring, diarré, letargi, sömn och koma. Mätningen av rektala temperaturer kan ge belägg för bradypnéreflex eller hypo/hypertermi relaterat till behandling eller inspärrning. Ytterligare utvärderingar kan inkluderas i studiens protokoll såsom kinetik, biologisk övervakning, lungfunktion, retention av svårlösliga ämnen som ackumuleras i lungvävnad, samt beteendeförändringar.

KROPPSVIKT

35. De enskilda djurens vikt bör registreras strax före den första exponeringen (dag 0), därefter två gånger i veckan (till exempel på fredagar och måndagar för att påvisa återhämtning över ett exponeringsfritt veckoslut, eller under ett tidsintervall för bedömning av systematisk toxicitet), och vid tidpunkten för dödsfallet eller avlivningen. Om inga effekter visas under de 4 första veckorna kan kroppsvikterna mätas en gång i veckan för återstoden av studien. Satellitdjur (reversibilitet) (om det används) ska fortsätta vägas varje vecka under hela återhämtningsperioden. Vid studiens upphörande bör samtliga djur vägas strax före avlivningen för en objektiv beräkning av förhållandet organ-kroppsvikt.

FÖDO- OCH VATTENINTAG

36. Födointaget bör mätas varje vecka. Vattenintaget bör också mätas.

▼M4

KLINISK PATOLOGI

37. Kliniska patologiska bedömningar bör göras av samtliga djur, inklusive kontroll- och satellitdjur (reversibilitet) när de avlivas. Tidsintervallet mellan exponeringens upphörande och insamlingen av blod ska registreras, i synnerhet när rekonstitueringen av endpointen är snabb. Provtagning efter att exponeringen har upphört indikeras för dessa parametrar med ett kort plasmaprov halvtid (t.ex. COHb, CHE och MetHb).

38. Tabell 1 listar de kliniska patologiska parametrar som i allmänhet krävs för alla toxikologiska studier. Urinanalys krävs inte rutinmässigt, men kan utföras när det bedöms lämpligt utifrån förväntad eller observerad toxicitet. Försöksledaren kan välja att bedöma ytterligare parametrar för att bättre kunna karakterisera en testkemikalies toxicitet (t.ex. kolinesteras, lipider, hormoner, syra/bas-balans, methemoglobin eller Heinz-kroppar, kreatinkinas, myeloid/erytroid-förhållande, troponiner, arteriella blodgaser, laktatdehydrogenas, sorbitaldehydrogenas, glutamatdehydrogenas och gamma-glutamyltranspeptidas).

Tabell 1

Standardiserade parametrar för klinisk patologi

Hematologi	
Erytrocytantal	Totalt antal leukocyter
Hematokrit	Differentalt leukocytantal
Hemoglobinkoncentration	Trombocytantal
Medelvärde för korpuskulärt hemoglobin	Koaguleringsförmåga (välj ett alternativ):
Medelvärde för korpuskulär volym	— Protrobintid
Medelvärde för korpuskulär hemoglobinkoncentration	— Koagulationstid
Retikulocyter	— Partiell tromboplastintid
Klinisk kemi	
Glukos (*)	Alaninaminotransferas
Totalkolesterol	Aspartataminotransferas
Triglycerider	Alkaliskt fosfatas
Blodureakväve	Kalium
Total bilirubin	Natrium
Kreatinin	Kalcium
Totalprotein	Fosfor
Albumin	Klorid
Globulin	
Urinalys (valfritt)	
Utseende (färg och grumlighet)	Totalprotein
Volym	Glukos
Specifik vikt eller osmolalitet	Blod/blodceller
pH	

(*) Eftersom en lång fasteperiod kan införa partiskhet i glukosmätningar för de behandlade djuren jämfört med kontrolldjuren, bör försöksledaren avgöra om det är lämpligt att djuren fastar. Om man använder en fasteperiod bör den vara avpassad för den art som används, för råtta kan det vara 16 timmar (fastande över natten). Bestämning av fasteglukos kan utföras efter en natts fasta under den sista exponeringsveckan, eller efter en natts fasta innan obduktionen (i det senare fallet tillsammans med alla andra kliniska patologiska parametrar).

▼M4

39. När det finns bevis på att de nedre luftvägarna (dvs. alveolerna) är den främsta platsen för deponering och lagring, då kan lungsköljning vara det tekniska valet för att kvantitativt analysera hypotesbaserade doseffektparametrar med fokus på alveolit, lunginflammation och fosfolipidos. Detta gör att dosrespons och tidsförloppsförändringar för alveolär skada grundligt kan undersökas. BAL-vätskan kan analyseras för totalt och differentiellt leukocytantal, totalprotein och laktatdehydrogenas. Andra parametrar som kan beaktas är de som tyder på lysosomal skada, fosfolipidos, fibros, och irriterande eller allergisk inflammation som kan innefatta bestämning av proinflammatoriska cytokiner/kemokiner. BAL-mätningar kompletterar i allmänhet resultaten från histopatologiska undersökningar, men kan dock inte ersätta dem. Vägledning om hur man utför lungsköljning finns i GD 39 (2).

OFTALMOLOGISK UNDERSÖKNING

40. Med ett oftalmoskop eller motsvarande anordning bör oftalmologiska undersökningar av fundus, brytningsmedia, iris och konjunktival utföras på samtliga djur före administreringen av testkemikalien, och för samtliga högkoncentrations- och kontrollgrupper vid avlivning. Om förändringar i ögonen upptäcks, ska samtliga djur i de andra grupperna undersökas, inklusive satellitgruppen (reversibilitet).

MAKROSKOPISK PATOLOGI OCH ORGANVIKTER

41. Samtliga försöksdjur, inklusive de som avlider under testet eller avlivas och tas bort från undersökningen av djurskyddsskäl, bör underkastas fullständig blodtömning (om möjligt) och obduceras. Tidsperioden mellan slutfasen av varje djurs exponering och dess avlivning ska registreras. Om en obduktion inte kan utföras omedelbart efter att ett dött djur påfunnits, bör djuret kylas (inte frysas) vid en temperatur som är tillräckligt låg för att minimera autolys. Obduktioner ska utföras så snart som möjligt, vanligtvis inom en dag eller två. Alla betydande patologiska förändringar bör registreras för varje djur med särskild uppmärksamhet på eventuella förändringar i luftvägarna.

42. Tabell 2 visar de organ och vävnader som bör bevaras i ett lämpligt medium under obduktion för histopatologisk undersökning. Bevarandet av organ och vävnader **[**inom hakparentes**]** och eventuellt andra organ och vävnader avgörs av försöksledaren. Organen i **fetstil** ska putsas och vägas våta så snart som möjligt efter dissektionen för att undvika uttorkning. Sköldkörteln och bitestiklarna bör endast vägas om det behövs, eftersom trimning av artefakter kan hindra en histopatologisk utvärdering. Vävnader och organ bör fixeras i 10 % buffrad formalin eller annat lämpligt fixativ så snart obduktionen utförts, och inte mindre än 24–48 timmar före trimning beroende på det fixativ som ska användas.

▼M4

Tabell 2

Organ och vävnader som bevaras vid obduktion

Binjurar	Esofagus
Aorta	[Luktbulb]
Benmärg (och/eller färskt aspirat)	**Äggstockar**
Hjärna (inklusive delar av cerebrum, cerebellum och medulla/pons)	Pankreas
Cekum	Biköldkörtlar
Kolon	Perifer nerv (ischias eller tibia), helst nära muskeln)
Tolvfingertarm	Hypofys
[**Epididymis**]	Prostata
(Ögon [retina, synnerv] och ögonlock)	Rektum
Lårbenet och knäleden	Spottkörtlar
Gallblåsa (i förekommande fall)	Sädesblåsor
[Harderiankörtlar]	Hud
Hjärta	Ryggmärg (cervikala, mitt på bröstkorgen och ländryggen)
Ileum	**Mjälte**
Jejunum	Bröstben
Njurar	Mage
[Tårkörtlar (extraorbitala)]	Tänder
Larynx (3 nivåer inklusive struplockets bas)	**Testiklar**
Lever	**Tymus**
Lungor (alla lober på en nivå, inklusive huvudbronker)	**Sköldkörtlar**
Lymkörtlar från lungans hilarregion, särskilt beträffande svårlösliga partikeltestkemikalier. För mer ingående undersökningar och/eller studier med immunologi i fokus kan ytterligare lymfkörtlar beaktas, t.ex. de från de mediastinala, cervikala/submandibulära och/eller aurikulära regionerna	[Tunga]
Lymfkörtlar (distalt från ingångshålet)	Luftstrupe (minst 2 nivåer inklusive 1 längdsnitt genom carina och 1 tvärsnitt)
Mjölkkörtlar (honor)	[Ureter]
Muskel (lår)	[Uretra]
Nasofaryngeala vävnader (minst 4 nivåer; 1 nivå för att inkludera den nasofaryngeala kanalen och den nasalassocierade lymfvävnaden (NALT))	Urinblåsa
	Uterus
	Målorgan
	Alla större skador och massor

▼M4

43. Lungorna bör avlägsnas intakta, vägas och indränkas med lämpligt fixativ vid ett tryck på 20–30 cm vatten för att säkerställa att lungstrukturen bibehålls (5). Sektioner bör samlas in för alla lober på en nivå, inklusive huvudbronker, men om lungsköljning utförs ska den osköljda loben sektioneras på tre nivåer (ej seriella sektioner).

44. Minst 4 nivåer av nasofaryngeala vävnader bör undersökas, varav en ska innehålla den nasofaryngeala kanalen (5) (6) (7) (8) (9) för en adekvat undersökning av den skvamösa, mellanliggande (icke-cilierade respiratoriska), respiratoriska (cilierade respiratoriska) och luktepitelet, och den dränerade lymfvävnaden (NALT((10) (11). Tre nivåer av struphuvudet bör undersökas, och en av dessa nivåer bör inkludera struplockets bas (12). Minst två nivåer av luftstrupen bör undersökas, inklusive ett längdsnitt genom förgreningen av carinan för de extrapulmonella bronkerna, samt ett tvärsnitt.

HISTOPATOLOGI

45. En histopatologisk utvärdering av alla organ och vävnader som räknas upp i tabell 2 bör utformas för kontroll- och högkoncentrationsgrupperna och för alla djur som dör eller avlivas under studien. Särskild uppmärksamhet bör ges åt luftvägarna, målorganen och större skador. Organ och vävnader som har skador i högkoncentrationsgruppen bör undersökas i alla grupper. Försöksledaren kan välja att utföra histopatologiska utvärderingar av flera grupper för att påvisa en tydlig koncentrationsrespons. Om en satellitgrupp (reversibilitet) används bör en histopatologisk utvärdering göras av samtliga vävnader och organ där effekter visats i de behandlade grupperna. Om det finns alltför många tidiga dödsfall eller andra problem i högkoncentrationsgruppen som äventyrar datans signifikans, bör nästa lägre koncentration undersökas histopatologiskt. Ett försök bör göras att korrelera större observationer i relation till mikroskopiska fynd.

DATA OCH RAPPORTERING

Data

46. Individuella data om djurens kroppsvikt, födointag, klinisk patologi, makroskopisk patologi, organvikter och histopatologi ska lämnas. Kliniska observationsdata bör sammanfattas i tabellform, som för varje testgrupp visar antalet djur som använts, antalet djur som visar tecken på toxicitet, antalet djur som avlidit under testet eller som avlivats av humanitära skäl, tidpunkten då det enskilda djuret har avlidit, beskrivning och tidsförlopp för toxiska verkningar och reversibilitet, samt obduktionsfynd. Samtliga resultat, kvantitativa och tillfälliga, ska utvärderas genom en lämplig statistisk metod. En allmänt vedertagen statistisk metod kan användas, och statistiska metoderna bör väljas under studiens utformning.

Testrapport

47. Testrapporten ska omfatta följande information, när så är lämpligt:

Försöksdjur och djurhållning

— Beskrivning av burförhållanden, inklusive antal (eller förändring av antal) djur per bur, strö, omgivningstemperatur och relativ fuktighet, ljusperiod och identifiering av kost.

▼M4

— Art/stam som används och motivering för att använda andra arter än råtta. Källor och historiska data kan tillhandahållas om de är från djur som har exponerats under liknande exponering, inhysning och fastebetingelser.

— Djurens antal, ålder och kön.

— Metod för randomisering.

— Beskrivning av eventuella förtestbetingelser inbegripet kost, karantän och behandling av sjukdomar.

Testkemikalie

— Fysikalisk natur, renhet och, i förekommande fall, fysikalisk-kemiska egenskaper (inbegripet isomerisering).

— Identifieringsdata och CAS-nummer (Chemical Abstract Services), om detta är känt.

Vehikel

— Motivering för användning av vehikel och valet av vehikel (om annat än vatten).

— Historiska eller parallella data som visar att vehikeln inte påverkar studiens slutresultat.

Inhalationskammare

— Detaljerad beskrivning av inhalationskammaren inklusive volym och ett diagram.

— Ursprung och beskrivning av utrustning som används för exponering av djur så väl som generering av atmosfär.

— Utrustning för mätning av temperatur, fuktighet, partikelstorlek och faktisk koncentration.

— Luftkälla och system som används för konditionering.

— Metoder som används för kalibrering av utrustning för att säkerställa en homogen testatmosfär.

— Tryckskillnad (positiv eller negativ).

— Exponeringsportar per kammare (enbart nos), placering av djur i kammaren (helkropp).

— Testatmosfärens stabilitet.

— Placering av temperatur- och fuktighetsgivare och provtagning av testatmosfären i kammaren.

— Behandling av luft som tillförs/extraheras.

— Luftflödeshastigheter, port för luftflöde och exponering (enbart nos), eller djurbelastning och kammare (helkropp).

— Tid tills inhalationskammaren har nått jämvikt (t95).

— Antal volymutbyten per timme.

— Mätutrustning (i förekommande fall).

Exponeringsdata

— Grund för valet av målkoncentration i huvudstudien.

▼M4

— Nominella koncentrationer (den totala massan av testkemikalien som genereras i inhalationskammaren dividerad med luftvolymen som passerar genom kammaren).

— Faktiska koncentrationer av testkemikalien som uppsamlats från djurens andningsapparat, för blandningar som bildar heterogena fysikaliska former (gaser, ångor, aerosoler), där var och en analyseras separat.

— Alla luftkoncentrationer bör redovisas i massenheter (mg/l, mg/m^3, etc.) snarare än volymenheter (ppm, ppb, etc.).

— Partikelstorleksfördelning, aerodynamisk massmediandiameter (MMAD) och geometrisk standardavvikelse (σ_g), inklusive metoderna för deras beräkning. Individuella partikelstorleksanalyser bör rapporteras.

Testbetingelser

— Uppgifter om beredning av testkemikalien, inklusive uppgifter om eventuella procedurer som använts för att minska partikelstorleken hos fasta material eller för att bereda testlösningar.

— En beskrivning (helst med ett diagram) av utrustningen som används för att generera testatmosfären och för att exponera djuren för denna atmosfär.

— Uppgifter om den utrustning som används för att övervaka kammarens temperatur, fuktighet och luftflöde (dvs. utarbetningen av en kalibreringskurva).

— Uppgifter om den utrustning som används för att samla in prover för bestämning av kammarens koncentration och partikelstorleksfördelning.

— Uppgifter om den kemiska analysmetod som används och metodvalidering (inklusive effektiviteten för återvinningen av testkemikalien från provtagningsmediet).

— Metod för randomisering av djur till test- och kontrollgrupper.

— Uppgifter om foder- och vattenkvalitet (inbegripet kosttyp/-källa och vattenförsörjning).

— Grunden för valet av testkoncentration.

Resultat

— Tabelluppställning av kammarens temperatur, fuktighet och luftflöde.

— Tabelluppställning av kammarens nominella och faktiska koncentrationsdata.

— Tabelluppställning av partikelstorleksdata som omfattar provtagningsdata, partikelstorleksfördelning och beräkning av MMAD och σ_g.

— Tabelluppställning av responsdata och koncentrationsnivåer för varje djur (dvs. djur som uppvisar tecken på toxicitet inklusive mortalitet, natur, allvarlighetsgrad, tidpunkt för första tecknet och effekternas varaktighet).

▼M4

— Tabelluppställning av de enskilda djurens vikt.

— Tabelluppställning av födointag.

— Tabelluppställning av kliniska patologiska data.

— Obduktionsfynd och histopatologiska fynd för varje djur, om detta finns tillgängligt.

Diskussion och tolkning av resultaten

— Särskild uppmärksamhet bör ges till beskrivningen av metoderna som används för att uppfylla kriterierna för denna testmetod t.ex. koncentrationsgräns eller partikelstorlek.

— Partiklarnas andningsbarhet i ljuset av de övergripande resultaten bör behandlas, särskilt om kriterierna för partikelstorlek inte kunde uppfyllas.

— Överensstämmelsen mellan metoderna som används för att bestämma nominell och faktisk koncentration, och förhållandet mellan faktisk och nominell koncentration bör ingå i den samlade bedömningen av studien.

— Den sannolika dödsorsaken och dominerande verkningsmekanism (systematisk mot lokal) bör behandlas.

— En förklaring bör ges om det fanns behov av att avliva djur, som visade tecken på uppenbar smärta eller svårt och ihållande lidande, av humanitära skäl på grundval av kriterierna i OECD:s vägledningsdokument om humana endpoints (3).

— Målorganet(en) bör identifieras.

— NOAEL och LOAEL bör bestämmas.

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

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

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

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

▼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 and Ward JM (eds) Carcinogenesis. Target Organ Toxicology Series, Raven Press, New York, 215–263.

(9) Mery S, Gross EA, Joyner DR, Godo M, Morgan KT (1994). Nasala diagram: 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) Europaparlamentets och rådets förordning (EG) nr 1272/2008 av den 16 december 2008 om klassificering, märkning och förpackning av ämnen och blandningar, ändring och upphävande av direktiven 67/548/EEG och 1999/45/EG samt ändring av förordning (EG) nr 1907/2006 (Text av betydelse för EES), EUT L 353, 31.12.2008, s. 1.

▼**M4**

Tillägg 1

DEFINITION

Testkemikalie: Alla ämnen eller blandningar som testas med denna testmetod.

▼M4

B.30 **STUDIER AV KRONISK TOXICITET**

INLEDNING

1. Den här testmetoden motsvarar OECD:s testriktlinje (TG) 452 (2009). Den ursprungliga TG 452 antogs 1981. Utvecklingen av denna reviderade testmetod B.30 ansågs nödvändig för att återspegla den senaste utvecklingen inom djurskydd och myndighetskrav (1) (2) (3) (4). Uppdateringen av denna testmetod B.30 har genomförts parallellt med revideringen av kapitel B.32 i denna bilaga, karcinogenicitetsstudier, och kapitel B.33 i denna bilaga, i syfte att erhålla ytterligare information om djuren som används i studien och ge ytterligare detaljer om val av dos. Den här testmetoden är avsedd att användas vid testning av ett brett spektrum av kemikalier, inklusive bekämpningsmedel och industrikemikalier.

2. Majoriteten av kroniska toxicitetsstudier genomförs med gnagare, och den här testmetoden är främst avsedd för studier som genomförs med dessa arter. Skulle sådana studier krävas för icke-gnagare gäller också de principer och förfaranden som beskrivs i denna testmetod, tillsammans med dem i kapitel B.27 i denna bilaga, 90-dagars oral toxicitetsstudie på icke-gnagare (5), med lämpliga ändringar som beskrivs i OECD:s vägledningsdokument nr 116 om utformning och genomförande av studier om kronisk toxicitet och karcinogenicitet (6).

3. De tre huvudsakliga administreringssätten som används i kroniska toxicitetsstudier är oral, dermal och inhalation. Valet av administreringssätt beror på de fysikaliska och kemiska egenskaperna hos testkemikalien och det dominerande exponeringssättet för människor. Ytterligare information om val av exponeringssätt ges i OECD:s vägledningsdokument nr 116 (6).

4. Den här testmetoden fokuserar på exponering via den orala vägen, den väg som används mest i kroniska toxicitetsstudier. Även om långsiktiga kroniska toxicitetsstudier som medför exponering via hud eller inhalation kan vara nödvändiga för riskbedömning av människors hälsa och/eller kan krävas under vissa regelverk, så innebär båda exponeringsvägarna en betydande teknisk komplexitet. Sådana studier måste utformas från fall till fall, även om testmetoden som beskrivs här för bedömningen och utvärderingen av kronisk toxicitet skulle kunna utgöra grunden för ett protokoll för inhalations- och/eller hudstudier, med hänsyn tagen till rekommendationer om behandlingsperioder, kliniska eller patologiska parametrar etc. OECD:s vägledning finns tillgänglig om administrering av testkemikalier genom inhalation (6) (7) och via huden (6). Kapitel B.8 i denna bilaga (8) och kapitel B.29 i denna bilaga (9), tillsammans med OECD:s vägledningsdokument om testning av akut inhalation (7), bör särskilt rådfrågas vid utformningen av långsiktiga studier som inbegriper exponering via inhalation. Kapitel B.9 i denna bilaga (10) bör rådfrågas när det gäller testning som utförs via huden.

▼M4

5. Studien om kronisk toxicitet ger information om möjliga hälsofaror som sannolikt kan uppstå vid upprepad exponering över en stor del av livslängden för de arter som används. Studien kommer att ge information om de toxiska effekterna hos testkemikalien, samt indikation om målorgan och möjlig ackumulering. Den kan också ge en uppskattning om de icke-observerade nivåerna för skadliga biverkningar som kan användas för att fastställa säkerhetskriterier för exponering av människor. Behovet av noggranna kliniska observationer av djuren i syfte att få fram så mycket information som möjligt betonas också.

6. Målen för de studier som omfattas av denna testmetod inkluderar:

— Identifieringen av den kroniska toxiciteten för en testkemikalie.

— Identifieringen av målorganen.

— Karakterisering av förhållandet dos-respons.

— Identifieringen av nivån där ingen skadlig effekt observeras (NOAEL) eller utgångspunkten för upprättandet av en referensdos (BMD).

— Förutsägelsen av kroniska toxicitetseffekter på nivåer för mänsklig exponering.

— Tillhandahållande av data för att testa hypoteser om verkningssätt (6).

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN

7. Vid bedömningen och utvärderingen av de toxikologiska egenskaperna hos en testkemikalie bör all tillgänglig information om testkemikalien beaktas av testlaboratoriet innan studien genomförs, i syfte att fokusera på utformningen av studien för att mer effektivt testa den kroniska toxicitetspotentialen och minimera användningen av djur. Information som underlättar studiens utformning inkluderar identitet, kemisk struktur, och fysikalisk-kemiska egenskaper hos testkemikalien, eventuell information om verkningssätt, resultat från eventuella in vitro- eller in vivo-toxicitetstester; förväntad användning(ar) och risken för mänsklig exponering, tillgängliga (Q)SAR-data och toxikologiska data om strukturellt närbesläktade kemikalier, tillgängliga toxikokinetiska data (engångsdos- och upprepad dos-kinetik om det finns tillgängligt) och data från andra studier med upprepad exponering. Fastställandet av kronisk toxicitet bör endast utföras efter att inledande information om toxicitet har erhållits från 28-dagars och/eller 90-dagars tester med upprepad dosering. Ett stegvist förhållningssätt till testning av kronisk toxicitet bör betraktas som en del av den övergripande bedömningen av de potentiella hälsoeffekterna för en viss testkemikalie (11) (12) (13) (14).

8. De statistiska metoder som är mest lämpade för analys av resultaten, med tanke på försöksutformningen och målen, bör fastställas innan studien påbörjas. Frågor att överväga kan inbegripa huruvida statistiken ska omfatta justeringar för överlevnad och analys i händelse av förtida avlivning av en eller flera grupper. Vägledning om lämpliga statistiska analyser och viktiga referenser till internationellt erkända statistiska metoder ges i vägledningsdokument nr 116 (6), samt i vägledningsdokument nr 35 om analys och utvärdering av studier över kronisk toxicitet och karcinogenicitet (15).

▼M4

9. Vid genomförandet av en studie om kronisk toxicitet bör man alltid följa de vägledande principer och överväganden som beskrivs i OECD:s vägledningsdokument nr 19 om erkännande, bedömning och användning av kliniska tecken som humana endpoints för försöksdjur som används i säkerhetsbedömningen (16). Se särskilt punkt 62. Detta avsnitt anger att ”I studier med upprepad dosering när ett djur visar kliniska tecken som är progressiva, vilket leder till ytterligare försämring av tillståndet, bör ett välgrundat beslut tas om man ska eller inte ska avliva djuret av humanitära skäl. Beslutet bör även omfatta övervägandet av värdet av informationen som fås genom fortsatt skötsel av det djuret i studien i förhållande till dess övergripande tillstånd. Om ett beslut har tagits att låta djuret kvarstå i testet, bör observationsfrekvensen ökas vid behov. Det är också möjligt, utan att allvarligt påverka syftet med testet, att tillfälligt upphöra med doseringen om det kan minska smärtan eller lidandet, eller att minska testdosen.”

10. Detaljerad vägledning om och diskussion om principerna för valet av dos för studier om kronisk toxicitet och karcinogenicitet finns i vägledningsdokument nr 116 (6) samt i två internationella publikationer från Life Sciences Institute (17) (18). Den centrala strategin för valet av dos är beroende av det primära målet eller målen med studien (punkt 6). Vid val av lämpliga dosnivåer bör en balans uppstå mellan faroundersökning å ena sidan och karakterisering av lågdosresponser och deras betydelse på den andra. Detta är särskilt relevant i en situation där en kombinerad studie av kronisk toxicitet och karcinogenicitet (kapitel B.33 i denna bilaga) genomförs (punkt 11).

11. Man bör överväga att genomföra en kombinerad studie av kronisk toxicitet och karcinogenicitet (kapitel B.33 i denna bilaga), snarare än ett separat utförande av en studie av kronisk toxicitet (denna testmetod B.30) och en studie av karcinogenicitet (kapitel B.32 i denna bilaga). Det kombinerade testet ger större effektivitet vad gäller tid och kostnad jämfört med att jämföra två separata studier, utan att man kompromissar med datans kvalitet i antingen den kroniska eller karcinogena fasen. Noggrant övervägande bör dock ges för principerna av valet av dos (punkterna 9 och 20–25) vid en kombinerad studie av kronisk toxicitet och karcinogenicitet (kapitel B.33 i denna bilaga), och det är också erkänt att separata studier kan krävas under vissa regelverk.

12. Definitioner som används inom ramen för den här metoden finns i slutet av det här kapitlet och i vägledningsdokumentet nr 116 (6).

PRINCIP FÖR TESTMETODEN

13. Testkemikalien administreras dagligen i graderade doser till flera grupper försöksdjur, i allmänhet under en 12-månadersperiod, även om kortare eller längre varaktigheter kan väljas beroende på myndighetskrav (se punkt 33). Denna längd är vald för att vara tillräckligt lång för att eventuella effekter av kumulativ toxicitet blir uppenbara, utan de störande effekterna av geriatriska förändringar. Avvikelser från exponeringstider på 12 månader bör motiveras, särskilt när det gäller kortare varaktigheter. Testkemikalien administreras normalt oralt även om inhalation eller via huden också kan vara lämpligt. Studiens utformning kan även omfatta en eller flera avlivningar t.ex. vid 3 eller 6 månader, och ytterligare djur kan inkluderas för att tillgodose detta (se punkt 19). Under administreringsperioden observeras djuren noggrant efter tecken på toxicitet. Djur som dör eller avlivas under testet obduceras, och i slutet av testet avlivas överlevande djur och obduceras.

▼M4

METODBESKRIVNING

Val av djurart

14. Den här testmetoden täcker främst bedömning och utvärdering av kronisk toxicitet hos gnagare (se punkt 2) även om liknande studier av icke-gnagare kan krävas under vissa regelverk. Valet av art bör motiveras. Utformning och genomförande av studier av kronisk toxicitet i icke-gnagare, när så krävs, bör baseras på de principer som beskrivs i denna testmetod tillsammans med dem i kapitel B.27 i denna bilaga, 90-dagars oral toxicitetsstudie på icke-gnagare (5). Ytterligare information om val av arter och stam ges i OECD:s vägledningsdokument nr 116 (6).

15. I den här testmetoden används råtta, även om andra gnagare t.ex. mus kan användas. Råttor och möss har föredragits på grund av deras relativt korta livslängd, deras breda användning i farmakologiska och toxikologiska studier, deras känslighet för tumörinduktion och tillgången på stammar som beskrivits tillräckligt ingående. Som en följd av dessa egenskaper finns en stor mängd information tillgänglig om deras fysiologi och patologi. I testet bör unga friska vuxna djur användas av stammar som vanligtvis används på laboratorier. Studien av kronisk toxicitet måste utföras med djur från samma stam och ursprung som de som användes i den inledande studien(rna) av toxicitet med kortare varaktighet. Honorna ska inte ha fått ungar och inte vara dräktiga.

Inhysnings- och utfodringsförhållanden

16. Djuren kan inhysas individuellt, eller i små grupper av samma kön; individuell inhysning ska endast övervägas om det är vetenskapligt motiverat (19) (20) (21). Burarna bör placeras så att en möjlig påverkan beroende på deras placering minimeras. Temperaturen i försöksdjurens utrymmen bör vara 22 °C (± 3 °C). Den relativa fuktigheten bör vara minst 30 % och helst inte överstiga 70 % utom när rummet rengörs, och målet bör vara 50–60 %. Belysningen bör vara artificiell, med omväxlande 12 timmar ljus och 12 timmar mörker. För utfodringen kan konventionellt laboratoriefoder användas med ett obegränsat utbud av dricksvatten. Kosten ska uppfylla alla näringsmässiga krav för arterna som testas och innehållet av föroreningar i kosten som kan påverka testresultatet inkluderar, men är ej begränsade till, bekämpningsmedelsrester, långlivade organiska föroreningar, fytoöstrogener, tungmetaller och mykotoxiner, och bör vara så låga som möjligt. Analytisk information om närings- och kostföroreningsnivåer bör genereras periodiskt, åtminstone i början av studien och när det finns en förändring i det använda partiet, och bör ingå i den slutliga rapporten. Analytisk information om dricksvattnet som används i studien ska likaledes ingå. Valet av foder kan påverkas av behovet av att säkerställa en lämplig blandning av en testkemikalie och för att tillgodose djurens näringsbehov när testkemikalien tillförs genom kosten.

Förberedelse av djuren

17. Friska djur, som har acklimatiserat sig till laboratoriets betingelser i minst 7 dagar och inte tidigare har ingått i försök, ska användas. När det gäller gnagare bör doseringen av djuren påbörjas snarast möjligt efter avvänjning och acklimatisering, och helst innan djuren är 8 veckor gamla. Försöksdjuren bör karakteriseras efter art, stam, ursprung, kön, vikt och ålder. Vid undersökningens början bör viktvariationen hos varje kön vara minimal och inte överstiga ± 20 % av medelvikten för alla djur inom studien, separat för

▼M4

varje kön. Djuren fördelas slumpvis i kontroll- och behandlingsgrupperna. Efter randomiseringen bör det inte finnas några signifikanta skillnader i genomsnittliga kroppsvikter mellan grupper inom varje kön. Om det finns statistiskt signifikanta skillnader, bör randomiseringssteget upprepas, om möjligt. Varje djur bör tilldelas ett unikt identifikationsnummer, och märkas permanent med detta nummer genom tatuering, mikrochipimplantat, eller med annan lämplig metod.

PROCEDUR

Djurens antal och kön

18. Bägge könen ska användas. Ett tillräckligt antal djur ska användas, så att det i slutet av studien finns tillräckligt många djur i varje grupp för en grundlig biologisk och statistisk utvärdering. För gnagare ska minst 20 djur per kön och grupp normalt användas vid varje dosnivå, medan det för icke-gnagare rekommenderas ett minsta antal av 4 per kön och grupp. I studier där möss ingår behövs fler djur i varje dosgrupp för att genomföra alla nödvändiga hematologiska bestämningar.

Avsättningar för avlivningar, satellitgrupper och kontrolldjur

19. Studien får föreskriva avlivningar (minst 10 djur/kön/grupp) t.ex. efter 6 månader för information om utvecklingen av toxikologiska förändringar och mekanistisk information, om det är vetenskapligt motiverat. Om sådan information om testkemikalien redan finns tillgänglig från tidigare toxicitetsstudier med upprepad dosering kanske inte avlivningar är vetenskapligt motiverade. Satellitgrupper kan också ingå för övervakning av reversibiliteten av eventuella toxikologiska förändringar som orsakats av den testkemikalie som undersöks, dessa begränsas normalt till studiens högsta dosnivå plus kontroll. Ytterligare en grupp kontrolldjur (normalt 5 djur per kön) kan också ingå för övervakning av sjukdomsstatus under studien (22), om nödvändigt. Om avlivning eller införlivande av satellit- eller kontrollgrupper planeras, ska antalet djur som ingår i studien ökas med det antal djur som ska avlivas innan studien slutförts. Dessa djur bör normalt genomgå samma observationer, inklusive kroppsvikt, foder-/vattenkonsumtion, hematologiska och kliniska biokemiska mätningar och patologiska undersökningar, som djuren i den kroniska toxicitetsfasen i huvudstudien, även om avsättningar också kan göras (i avlivningsgruppen) för att mätningarna ska begränsas till vissa viktiga mätningar såsom neurotoxicitet eller immunotoxicitet.

Dosgrupper och dosering

20. Vägledning över alla aspekter av valet av dos och dosnivå finns i vägledningsdokument nr 116 (6). Minst tre dosnivåer och en parallell kontroll ska användas, utom om ett toleranstest utförs (se punkt 27). Dosnivåer grundas i allmänhet på resultaten från en korttidsstudie med upprepad dosering eller en spännviddsstudie och bör beakta eventuella toxikokinetiska data som finns tillgängliga om testkemikalien eller närbesläktade kemikalier.

▼M4

21. Såvida den inte är begränsad genom testkemikaliens fysikalisk-kemiska natur eller biologiska verkningar, bör den högsta dosnivån normalt väljas för att identifiera de viktigaste målorganen och de toxiska effekterna samtidigt som man undviker lidande, svår toxicitet, sjuklighet eller död. Samtidigt som man tar hänsyn till de faktorer som anges nedan i punkt 22, ska den högsta dosnivån väljas för att framkalla tecken på toxicitet, vilket framgår av till exempel en sänkning av kroppsviktsökningen (ca 10 %).

22. Dock kan man beroende på målen för studien (se punkt 6), välja en toppdos lägre än den dos som ger tecken på toxicitet, t.ex. om en dos framkallar en negativ effekt som har liten eller ingen påverkan på livslängd eller kroppsvikt. Den övre dosen bör inte överskrida 1 000 mg/kg kroppsvikt/dag (gränsdos, se punkt 27).

23. Dosnivåer och dosnivåspridning kan väljas för att etablera en dosrespons och en NOAEL eller andra avsedda resultat av studien, t.ex. en BMD (se punkt 25) för den lägsta dosnivån. Faktorer som bör beaktas i placeringen av lägre doser inkluderar den förväntade lutningen för dosrespons-kurvan, de doser vid vilka viktiga förändringar kan uppstå i metabolismen eller den toxiska verkningens art, där ett tröskelvärde förväntas eller där en utgångspunkt för lågdosextrapolering förväntas.

24. Den dosnivåspridning som väljs beror på testkemikaliens egenskaper och kan inte föreskrivas i denna testmetod, men två- till fyrfaldiga dosintervall ger ofta bra testprestanda för att fastställa fallande dosnivåer, och tillägg av en fjärde testgrupp är att föredra framför användningen av mycket stora intervall (t.ex. en faktor på mer än ca 6–10) mellan doseringarna. I allmänhet bör användningen av faktorer som är större än 10 undvikas och motiveras om de används.

25. Som beskrivs vidare i vägledningsdokument nr 116 (6), inkluderar punkter som ska beaktas vid val av dos:

— Kända eller misstänkta olinjäriteter eller inflexionspunkter i dosresponsen.

— Toxikokinetik och dosintervall där metabolisk induktion, mättnad eller olinjäritet mellan externa och interna doser uppträder eller ej.

— Utgångsskador, markörer för verkan eller indikatorer för viktiga underliggande biologiska processer.

— Nyckelaspekter (eller misstänkta sådana) för verkningsmekanismer, såsom doser vid vilka cytotoxicitet börjar uppstå, hormonnivåerna störs, homeostatiska mekanismer är överväldigande etc.

— Områden i dosrespons-kurvan där en särskilt stabil uppskattning behövs, t.ex. intervallet för förväntad BMD eller ett misstänkt tröskelvärde.

— Beaktande av förväntade exponeringsnivåer för människor.

▼M4

26. Kontrollgruppen ska vara en obehandlad grupp eller en vehikelkontrollgrupp, om en vehikel används för tillförsel av testkemikalien. Med undantag av behandlingen med testkemikalien, bör djuren i kontrollgruppen hanteras på exakt samma sätt som de i testgrupperna. Om en vehikel används ska kontrollgruppen tillföras vehikeln i den största volym som används bland dosgrupperna. Om en testkemikalie tillförs via kosten och förorsakar ett betydligt minskat intag på grund av mindre välsmakande kost, kan ytterligare en parutfodrad kontrollgrupp vara användbar för en lämpligare kontroll.

27. Om det kan förväntas, baserat på information från inledande studier, att ett test med en dosnivå motsvarande minst 1 000 mg/kg kroppsvikt/dag med hjälp av de förfaranden som beskrivs här inte ger några skadliga effekter, och om toxicitet inte förväntas baserat på data från strukturellt besläktade kemikalier, anses en fullständig studie med tre dosnivåer inte vara nödvändig. En gräns på 1 000 mg/kg kroppsvikt/dag kan tillämpas, utom när mänsklig exponering anger att en högre dosnivå ska användas.

Beredning av doser och administrering av testkemikalie

28. Testkemikalien tillförs vanligtvis oralt, via kosten eller dricksvattnet, eller genom sondmatning. Ytterligare information om vägar och metoder för administrering ges i OECD:s vägledningsdokument nr 116 (6). Vägen och metoden för administrering beror på syftet med studien, de fysikalisk/kemiska egenskaperna hos testkemikalien, dess biotillgänglighet och dominerande väg och metod för exponering av människor. En motivering bör ges för vald väg och metod för administrering. Med tanke på djurskydd bör oral sondmatning normalt väljas endast för de ämnen för vilka denna väg och metod för administrering representerar en potentiell mänsklig exponering (t.ex. läkemedel). För kost- eller miljökemikalier inklusive bekämpningsmedel, sker administrering vanligtvis via foder eller dricksvatten. För några situationer, t.ex. arbetsrelaterad exponering, kan administrering via andra vägar vara lämpligare.

29. Vid behov kan testkemikalien upplösas eller suspenderas i en lämplig vehikel. Hänsyn bör tas till följande egenskaper hos vehikeln och andra tillsatsämnen, i förekommande fall: Verkningar på absorption, distribution, metabolism eller retention av testkemikalien, verkningar på testkemikaliens kemiska egenskaper som kan förändra dess toxiska egenskaper samt påverkan på foder- eller vattenkonsumtion, eller djurens nutritionsstatus. Det rekommenderas, när så är möjligt, att man först använder en vattenbaserad lösning/suspension följt av en lösning/emulsion i olja (t.ex. majsolja) och därefter eventuell lösning i andra vehiklar. För andra vehiklar än vatten bör de toxiska egenskaperna hos vehikeln vara kända. Information om testkemikaliens stabilitet och doseringslösningarnas eller fodrets homogenitet (i förekommande fall) enligt villkoren för administrering (t.ex. kost), bör finnas tillgängliga.

30. För kemikalier som tillförs via foder eller dricksvatten är det viktigt att säkerställa att kvantiteterna av den berörda testkemikalien inte påverkar normal närings- eller vattenbalans. I långtidsstudier med kostadministrering bör koncentrationen av testkemikalien i fodret normalt inte överskrida en övre gräns på 5 % av den totala kosten, för att undvika näringsmässig obalans. När testkemikalien tillförs via kosten, kan antingen en konstant foderkoncentration (mg/kg foder eller ppm) eller en konstant dosnivå i förhållande till djurens kroppsvikt (mg/kg kroppsvikt), beräknad på veckobasis, användas. Det alternativ som används ska anges.

▼M4

31. Vad gäller oral administrering doseras djuren med testkemikalien dagligen (sju dagar i veckan), vanligtvis under en period på 12 månader (se också punkt 33), även om en längre varaktighet kan krävas beroende på myndighetskrav. Alla andra doseringsscheman, t.ex. fem dagar per vecka, måste motiveras. När det gäller dermal administrering, behandlas djuren normalt med testkemikalien minst 6 timmar per dag, 7 dagar per vecka, enligt kapitel B.9 i denna bilaga (10), under en period av 12 månader. Exponering genom inhalation utförs 6 timmar per dag, 7 dagar per vecka, men exponering 5 dagar per vecka kan också användas om detta är motiverat. Exponeringsperioden är normalt en period på 12 månader. Om andra gnagare än råttor utsätts för enbart nos, kan de maximala exponeringstiderna justeras för att minska artspecifikt lidande. En motivering bör ges när man använder en exponeringstid kortare än 6 timmar per dag. Se också kapitel B.8 i denna bilaga (8).

32. När en testkemikalie administreras via sondmatning bör detta ske via en magsond eller en lämplig intubationskanyl vid ungefär samma tid varje dag. Normalt administreras en singeldos en gång per dag, men om en kemikalie är lokalt irriterande är det möjligt att upprätthålla den dagliga dosen genom delad dos (två gånger per dag). Den största mängd vätska som kan administreras vid ett tillfälle beror på försöksdjurets storlek. Volymen bör vara så liten som möjligt, och bör normalt inte överstiga 1 ml/100 g kroppsvikt för gnagare (22). Variationer i testvolym bör minimeras genom justering av koncentrationen för att säkerställa en konstant volym vid alla dosnivåer. Potentiellt frätande eller irriterande kemikalier är undantagna, och måste spädas ut för att allvarliga lokala verkningar ska kunna undvikas. Testning vid koncentrationer som sannolikt är frätande eller irriterande för magtarmkanalen bör undvikas.

Studiens varaktighet

33. Även om den här testmetoden främst är utformad som en 12-månaders kronisk toxicitetsstudie kan den tillämpas på antingen kortare (t.ex. 6 eller 9 månader) eller längre (t.ex. 18 eller 24 månader) varaktighetsstudier, beroende på kraven för särskilda regelverk eller särskilda mekanistiska ändamål. Avvikelser från en exponeringstid på 12 månader bör motiveras, särskilt när det gäller kortare varaktigheter. Satellitgrupper som ingår för att övervaka reversibiliteten av eventuella toxikologiska förändringar som orsakats av den testkemikalie som undersöks, ska bibehållas utan dosering under en period som inte är kortare än 4 veckor och inte längre än en tredjedel av den totala studieperioden efter avslutad exponering. Ytterligare vägledning, inklusive en bedömning av överlevnaden i studien finns i vägledningsdokument nr 116 (6).

IAKTTAGELSER

34. Samtliga djur bör observeras beträffande sjuklighet eller mortalitet, vanligtvis i början och slutet av varje dag, inklusive helger och helgdagar. Allmänna kliniska observationer bör göras minst en gång per dag, helst vid samma tidpunkt(er), och ta hänsyn till maximalt förväntade effekter efter doseringen när det gäller administrering via sondmatning.

▼M4

35. Detaljerade kliniska observationer bör göras på samtliga djur minst en gång före den första exponeringen (för jämförelser inom samma objekt), i slutet av studiens första vecka och därefter varje månad. Observationsprotokollet bör anordnas så att variationerna mellan enskilda observatörer minimeras och är oberoende av testgrupp. Dessa observationer bör göras utanför buren på avsedd plats, ungefär vid samma tidpunkter varje gång. De bör noggrant registreras, helst med hjälp av ett poängsystem som utförligt definierats av testlaboratoriet. Ansträngningar bör göras för att säkerställa att variationer i observationsbetingelserna är minimala. Observationerna bör omfatta, men inte begränsas till, förändringar av hud, päls, ögon, slemhinnor, förekomst av sekret och utsöndringar samt autonom aktivitet (t.ex. tårflöde, upprest hårrem, pupillstorlek och ovanligt andningsmönster). Förändringar i gång, hållning och reaktion på hantering liksom eventuella kramper eller spasmer, stereotypier (t.ex. överdrivet putsande, repetitivt cirklande) eller bisarrt beteende (t.ex. självstympning, baklängesgång) bör också registreras (24).

36. En oftalmologisk undersökning med ett oftalmoskop eller annan lämplig utrustning bör utföras på samtliga djur före den första administreringen av testkemikalien. Vid slutet av studien bör denna undersökning helst utföras på samtliga djur, men åtminstone på högdos- och kontrollgrupperna. Om behandlingsrelaterade ögonförändringar upptäcks bör samtliga djur undersökas. Om strukturell analys eller annan information tyder på okulär toxicitet bör frekvensen på okulära undersökningar höjas.

37. För kemikalier där tidigare 28-dagars och/eller 90-dagars toxicitetstest med upprepad dosering indikerade en potential för att framkalla neurotoxiska effekter, bör sensorisk reaktion på stimuli av olika slag (24) (t.ex. hörsel, syn och djupsensorisk stimuli) (25), (26), (27), bedömning av greppstyrka (28) och bedömning av motorisk aktivitet (29) eventuellt utföras före studiestarten och vid 3-månadersperioder efter studiestarten till och med 12 månader, samt vid studiens upphörande (om längre än 12 månader). Ytterligare uppgifter om de procedurer som kan följas finns i respektive hänvisningar. Dock kan andra procedurer än de som hänvisats till också användas.

38. För kemikalier där tidigare 28-dagars och/eller 90-dagars toxicitetstester med upprepad dosering indikerade en potential för att orsaka immunologiska effekter, kan ytterligare undersökningar av denna endpoint eventuell utföras vid avslutningen.

Kroppsvikt, foder-/vattenkonsumtion och fodereffektivitet

39. Samtliga djur bör vägas vid behandlingens början, minst en gång i veckan de första 13 veckorna och därefter minst en gång per månad. Mätningar av foderkonsumtion och fodereffektivitet bör minst göras varje vecka de 13 första veckorna och därefter minst en gång per månad. Vattenkonsumtionen bör mätas minst en gång per vecka de 13 första veckorna, och därefter minst varje månad, när kemikalien administreras via dricksvattnet. Mätningar av vattenkonsumtionen bör också övervägas för studier där vattendrickandet förändras.

▼M4

Hematologi och klinisk biokemi

40. I studier med gnagare bör hematologiska undersökningar utföras på minst 10 handjur och 10 hondjur per grupp, vid 3, 6 och 12 månader, samt vid studiens slut (om längre än 12 månader), på samma djur hela tiden. Satellitdjur kan behövas när det gäller möss för att genomföra alla nödvändiga hematologiska bestämningar (se punkt 18). För icke-gnagare måste prover tas från ett mindre antal djur (t.ex. 4 djur per kön och per grupp för hundstudier) vid mellanliggande provtagningstillfällen och avslutandet enligt vad som beskrivits för gnagare. Mätningar vid 3 månader, antingen på gnagare eller icke-gnagare, behöver inte utföras om inga effekter syntes på hematologiska parametrar i en tidigare 90-dagars studie som genomfördes med jämförbara dosnivåer. Blodprover bör tas under narkos från angivet ställe, till exempel genom hjärtpunktering eller från retro-orbitalsinus.

41. Följande lista över parametrar bör undersökas (30): total- och differentialräkning av vita blodkroppar, erytrocytantal, trombocytantal, hemoglobinkoncentration, hematokrit (packad cellvolym), medelvärde för korpuskulärvolym (MCV), medelvärde för korpuskulärt hemoglobin (MCH), medelvärde för korpuskulär hemoglobinkoncentration (MCHC), protrombintid och aktiverad partiell tromboplastintid. Övriga hematologiska parametrar såsom Heinz-kroppar eller annan atypisk erytrocytmorfologi eller methemoglobin kan mätas på lämpligt sätt beroende på testkemikaliens toxicitet. Sammantaget bör en flexibel strategi antas, beroende på den observerade och/eller förväntade verkningen av en given testkemikalie. Om testkemikalien har en effekt på det hematopoetiska systemet, kan retikulocytantal och benmärgscytologi också anges, men detta behöver inte utföras rutinmässigt.

42. Kliniska biokemiska bestämningar för att undersöka större toxiska effekter i vävnader och, särskilt, effekter på lever och njurar bör utföras på blodprov från minst 10 handjur och 10 hondjur per grupp, vid samma tidsintervall som specificerades för den hematologiska undersökningen, med samma djur hela tiden. Satellitdjur kan behövas när det gäller möss för att genomföra alla nödvändiga kliniska biokemiska bestämningar. För icke-gnagare måste prover tas från ett mindre antal djur (t.ex. 4 djur per kön och per grupp för hundstudier) vid mellanliggande provtagningstillfällen och avslutandet enligt vad som beskrivits för gnagare. Mätningar vid 3 månader, antingen på gnagare eller icke-gnagare, behöver inte utföras om inga effekter syntes på kliniska biokemiska parametrar i en tidigare 90-dagars studie som genomfördes med jämförbara dosnivåer. Det rekommenderas att djuren fastar över natten (med undantag av möss) före blodprovstagningen. Följande lista över parametrar bör undersökas (30): glukos, urea (ureakväve), kreatinin, totalprotein, albumin, kalcium, natrium, kalium, totalkolesterol, minst två lämpliga tester för hepatocellular utvärdering (alaninaminotransferas, aspartataminotransferas, glutamatdehydrogenas, totala gallsyror) (31), och minst två lämpliga tester för hepatobiliär utvärdering (alkaliskt fosfatas, gammaglutamyl transferas, 5'-nukleotidas, totalt bilirubin, totala gallsyror) (31). Andra kliniska kemiska parametrar såsom triglycerider vid fasta, specifika hormoner och kolinesteras kan mätas på lämpligt sätt, beroende på testkemikaliens toxicitet. Sammantaget finns det ett behov av en flexibel strategi, beroende på den observerade och/eller förväntade verkningen av en given testkemikalie.

▼M4

43. Urinanalyserna bör utföras på minst 10 handjur och 10 hondjur per grupp, på prov som tagits vid samma intervaller som för hematologi och klinisk kemi. Mätningar vid 3 månader behöver inte utföras om ingen effekt syntes på urinanalysen i en tidigare 90-dagars studie som genomfördes med jämförbara dosnivåer. Följande lista över parametrar ingick i en sakkunnig rekommendation om kliniska patologiska studier (30): utseende, volym, osmolalitet eller specifik vikt, pH, totalprotein och glukos. Andra bestämningar inkluderar keton, urobilinogen, bilirubin och ockult blödning. Ytterligare parametrar kan användas vid behov för att utvidga undersökningen av observerad(e) verkning(ar).

44. Det anses allmänt att utgångsvärden för hematologiska och kliniska kemiska variabler behövs före behandlingen i hundstudier, men inte behöver bestämmas för studier i gnagare (30). Om historiska basdata (se punkt 50) är otillräckliga bör man överväga att generera sådana data.

Patologi

Obduktion

45. Samtliga djur i studien bör normalt underkastas en fullständig obduktion, som omfattar omsorgsfull granskning av kroppens yttre ytor, alla kroppsöppningar samt kranium, bröst- och bukhåla och deras innehåll. En bestämmelse kan också göras (i avlivnings- eller satellitgrupperna) så att mätningarna begränsas till vissa viktiga åtgärder, såsom neurotoxicitet eller immunotoxicitet (se punkt 19). Dessa djur behöver inte obduceras och efterföljande procedurer beskrivs i nedanstående punkter. Obduktion kan från fall till fall krävas av indikatordjur, efter beslut av försöksledaren.

46. Organvikter bör samlas från samtliga djur, förutom de som undantas genom den senare delen av punkt 45. Binjurar, hjärna, bitestiklar, hjärta, njurar, lever, äggstockar, mjälte, testiklar, sköldkörtel (vägda efter fixering, med bisköldkörtlar) och livmoder från samtliga djur (bortsett från de döende och/eller avlivade) putsas från angränsande vävnad, i förekommande fall, och deras våtvikt bestäms så snart som möjligt efter dissektionen för att undvika uttorkning. I studier med möss är det valfritt med vägning av binjurarna.

47. Följande vävnader bör bevaras i det mest lämpade fixeringsmedlet för både vävnadstypen och den planerade efterföljande histopatologiska undersökningen (32) (vävnader inom hakparenteser är valfria):

alla större skador	hjärta	pankreas	mage (förmagen, glandulärmagen)
binjure	ileum	bisköldkörtel	[tänder]
aorta	jejunum	perifer nerv	testikel
hjärna (inklusive delar av cerebrum, cerebellum och medulla/pons)	njure	hypofys	tymus
cekum	tårkörtel (exorbital)	prostata	sköldkörtel
cervix	lever	rektum	[tunga]

▼M4

koagulerande körtel	lunga	spottkörtel	trakea
kolon	lymfkörtlar (både ytliga och djupa)	sädesblåsa	urinblåsa
tolvfingertarm	bröstkörtel (obligatorisk för honor, och om synlig och dissekeringsbar hos hanar)	skelettmuskel	uterus (inklusive cervix)
bitestikel	[övre luftvägarna, inklusive nos, turbinates och bihålorna]	hud	[ureter]
öga (inklusive näthinna)	esofagus	ryggmärg (på tre nivåer: cervikal, mitt på bröstkorgen och ländryggen)	[uretra]
[lårben med led]	[luktbulb]	mjälte	vagina
gallblåsa (för andra arter än råtta)	äggstock	[bröstben],	snitt av ryggmärgen och/eller ett färskt benmärgsaspirat
Harderiankörtel			

När det gäller parvisa organ t.ex. njure, binjure, bör båda organen bevaras. Kliniska och andra fynd kan indikera behovet av att undersöka ytterligare vävnader. Också alla organ som sannolikt är målorgan, baserat på kunskap om testkemikaliens egenskaper, ska konserveras. I studier som inbegriper administrering via huden bör organen som anges för oralt intag bevaras, och det är viktigt med särskild provtagning och bevarande av huden där appliceringen har skett. I inhalationsstudier bör förteckningen över bevarade och undersökta vävnader från luftvägarna följa rekommendationerna i kapitel B.8 (8) och kapitel B.29 i denna bilaga (9). För andra organ/vävnader (och i tillägg till de specifikt bevarade vävnaderna från luftvägarna) bör de organ som finns i förteckningen som anges för den orala vägen undersökas.

Histopatologi

48. Vägledning finns tillgänglig om bästa praxis vid genomförande av studier gällande toxikologisk patologi (32). Den minsta histopatologiska undersökningen bör vara:

— Alla vävnader från högdos- och kontrollgrupperna.

— Alla vävnader från djur som dör eller avlivas under studien.

— Alla vävnader som uppvisar makroskopiska abnormaliteter.

— Målvävnader, eller vävnader som uppvisade behandlingsrelaterade förändringar i högdosgruppen, från samtliga djur i alla andra doseringsgrupper.

— När det gäller parvisa organ t.ex. njure, binjure, bör båda organen undersökas.

▼M4

DATA OCH RAPPORTERING

Data

49. Individuella data för samtliga utvärderade parametrar bör ges. Därutöver bör alla data sammanfattas i tabellform, som för varje testgrupp visar antal djur vid testets början, antal djur som påfanns döda under testet eller som avlivats av humanitära skäl och tidpunkten för dödsfallen eller avlivningen, antal djur som visar tecken på toxicitet, en beskrivning av de tecken på toxicitet som observerats, inklusive tidpunkt för de första tecknen, varaktighet och hur allvarliga de toxiska verkningarna är, antal djur som uppvisar skador, typ av skador och procentandelen djur för varje typ av skada. Sammanfattande tabeller bör ge medelvärden och standardavvikelser (för kontinuerliga testdata) för djur som uppvisar toxiska effekter eller skador, i tillägg till skadornas gradering.

50. Historiska kontrolldata kan vara värdefulla vid tolkningen av studiens resultat, t.ex. i de fall då det finns indikationer på att de data som lämnats från de parallella kontrollerna i huvudsak avviker jämfört med aktuell data från kontrolldjuren från samma testanläggning/-koloni. Historiska kontrolldata, om de har utvärderats, bör lämnas in från samma laboratorium och relatera till djur i samma ålder och av samma stam som genererats under de fem år som föregick studien i fråga.

51. När det är tillämpligt bör numeriska resultat utvärderas genom en lämplig och allmänt vedertagen statistisk metod. De statistiska metoderna och datan som ska analyseras bör väljas vid utformningen av studien (punkt 8). Valet bör innehålla bestämmelser om överlevnadsjusteringar, där så krävs.

Testrapport

52. Testrapporten ska omfatta följande information:

Testkemikalie:

— Fysikalisk natur, renhet och fysikalisk-kemiska egenskaper.

— Identifikationsuppgifter.

— Kemikaliens källa.

— Satsnummer.

— Intyg om kemisk analys.

Vehikel (i förekommande fall):

— Motivering för val av vehikel (om annan än vatten).

Försöksdjur:

— Art/stam som används och motivering av valet.

— Djurens antal, ålder och kön vid testets början.

▼M4

— Ursprung, inhysning, kost etc.

— Djurens individuella vikt vid testets början.

Försöksbetingelser:

— Grund för administreringssätt och dosval.

— I förekommande fall, de statistiska metoderna som använts för att analysera datan.

— Uppgifter om testkemikaliens sammansättning/foderberedning.

— Analysdata om beredningens uppnådda koncentration, stabilitet och homogenitet.

— Administreringssätt och uppgifter om testkemikaliens administrering.

— Om enbart nos eller helkropp vid inhalationsstudier.

— Faktiska doser (mg/kg kroppsvikt/dag) och omräkningsfaktor för kostens/dricksvattnets testkemikaliekoncentration (mg/kg eller ppm) till den faktiska dosen, om tillämpligt.

— Uppgifter om foder- och vattenkvalitet.

Resultat (sammanfattande data i tabellform och enskilda djurdata ska presenteras):

— Överlevnadsdata.

— Kroppsvikt/kroppsviktsförändringar.

— Foderförbrukning, beräkningar av fodereffektivitet, om det har utförts, och vattenförbrukning, om tillämpligt.

— Uppgifter om toxiska reaktioner efter kön och dosnivå, inklusive tecken på toxicitet.

— Art, förekomst (och, om protokoll förts, allvarlighetsgrad) och de kliniska observationernas varaktighet (om övergående eller permanenta).

— Oftalmologiska undersökningar.

— Hematologiska tester.

— Kliniska biokemiska undersökningar.

— Urinanalystester.

— Resultaten från eventuella undersökningar av neurotoxicitet eller immunotoxicitet.

— Terminal kroppsvikt.

— Organvikter (och deras kvoter, om tillämpligt).

— Obduktionsfynd.

— En detaljerad beskrivning av samtliga behandlingsrelaterade histopatologiska fynd.

— Absorptionsdata, i förekommande fall.

▼M4

Statistisk bearbetning av resultaten, när så är lämpligt

Diskussion av resultaten, inklusive:

— Dos: responssamband

— Beaktande av eventuell information om verkningssätt.

— Diskussion om eventuella modellstrategier.

— BMD-, NOAEL- eller LOAEL-bestämning.

— Historiska kontrolldata.

— Relevans för människor.

Slutsatser

LITTERATUR

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

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

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

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

(5) Kapitel B.27 i denna bilaga, test avseende subkronisk oral toxicitet (90-dagars upprepat oraltest på icke-gnagare).

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

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

(8) Kapitel B.8 i denna bilaga, subakut inhalationstoxicitet: 28-dagars studie.

(9) Kapitel B.29 i denna bilaga, subkronisk inhalationstoxicitet: 90-dagars studie.

(10) Kapitel B.9 i denna bilaga, toxicitet vid upprepad dosering (28 dagar, dermalt).

(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, No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.

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

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

(19) Europaparlamentets och rådets direktiv 2010/63/EU av den 22 september 2010 om skydd av djur som används för vetenskapliga ändamål (EUT L 276, 20.10.2010, s. 33).

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

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

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

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

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

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

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

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

(28) Meyer OA, Tilson HA, Byrd WC, Riley MT (1979). A Method for the RoutineAssessment of Fore- and 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 (draft) document ”Non-clinical guideline on drug-induced hepatotoxicity” (Doc. Ref. EMEA/CHMP/SWP/a50115/2006).

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

▼**M4**

Tillägg 1

DEFINITION

Testkemikalie: Alla ämnen eller blandningar som testas med denna testmetod.

▼B

B.31 **TEST AVSEENDE PRENATAL UTVECKLINGSTOXICITET**

1. **METOD**

Denna metod är i stort sett identisk med OECD TG 414 (2001).

1.1 INLEDNING

Denna metod för test av utvecklingstoxicitet är avsedd att ge allmän information om verkningarna av prenatal exponering på dräktiga försöksdjur och på den organism som utvecklas i livmodern. Detta kan inbegripa utvärdering av verkningarna på såväl modern som på fostret (död, strukturella abnormaliteter eller avvikande tillväxt). Funktionsstörningar omfattas inte av denna testmetod, även om de utgör en viktig del av utvecklingen. Funktionsstörningar kan testas separat eller i kombination med detta test genom användning av metoden för test avseende utvecklingsneurotoxicitet. För information om testning av funktionsstörningar och andra postnatala verkningar hänvisas till testmetoden för reproduktionstoxicitet på två generationer och till testmetoden för utvecklingsneurotoxicitet.

Denna testmetod kan i enskilda fall behöva anpassas i enlighet med speciell kännedom om t.ex. de fysikalisk-kemiska eller toxikologiska egenskaperna hos det ämne som testas. Sådan anpassning kan godtas om det föreligger övertygande vetenskapliga bevis om att anpassningen leder till ett mer informativt test. I sådana fall bör testrapporten innehålla en detaljerad redogörelse för de vetenskapliga bevis som åberopas.

1.2 DEFINITIONER

Utvecklingstoxikologi: Undersökning av sådana skadliga verkningar på en organism under utveckling som kan uppstå till följd av exponering före befruktningen, under den prenatala utvecklingen eller postnatalt fram till könsmognaden. Utvecklingstoxiciteten tar sig främst uttryck som 1) organismens död, 2) strukturell abnormalitet, 3) avvikande tillväxt och 4) funktionsstörningar. Utvecklingstoxicitet benämndes tidigare ofta teratogenicitet.

Skadlig verkning: Varje sådan behandlingsrelaterad avvikelse från normaltillståndet som minskar organismens förmåga att överleva, föröka sig eller anpassa sig till omgivningen. Begreppet utvecklingstoxicitet i dess vidaste mening omfattar alla verkningar som stör den normala utvecklingen hos conceptus, både före och efter födseln.

Avvikande tillväxt: En vikt- eller storleksavvikelse hos avkommans organ eller kropp.

Avvikelser (anomalier): Strukturella utvecklingsavvikelser; här inbegrips både missbildningar och variationer (28).

Missbildning/betydande abnormalitet: En strukturell ändring som bedöms vara skadlig för djuret (kan också vara dödlig) och som i regel är sällsynt.

▼B

Variation/mindre abnormalitet: En strukturell ändring som bedöms vara endast lite eller inte alls skadlig för djuret; den kan vara övergående och vara relativt vanlig hos kontrollpopulationen.

Conceptus: Summan av derivat från ett befruktat ägg vid varje utvecklingsstadium från befruktning till födsel; här inbegrips omgivande membran samt själva embryot eller fostret.

Implantation (nidation): Det förlopp då blastocyten fäster sig vid livmoderns epitelhinna; här ingår blastocytens penetrering av livmoderepitelet och inbäddning i endometriet.

Embryo: Det tidiga utvecklingsstadiet hos en organism, särskilt den produkt som utvecklas till följd av befruktningen av ett ägg, från det att den långa axeln har framträtt tills alla viktiga strukturer finns närvarande.

Embryotoxicitet: Skadlig för den normala strukturen, utvecklingen, tillväxten eller livsdugligheten hos ett embryo.

Foster: Den ofödda avkomman under den postembryonala perioden.

Fostertoxicitet: Skadlig för den normala strukturen, utvecklingen, tillväxten eller livsdugligheten hos ett foster.

Abort: Prematur utstötning av befruktningsprodukterna (embryot eller ett icke-livsdugligt foster) ur livmodern.

Resorption: Conceptus som har dött efter implantationen i livmodern och som resorberas eller har resorberats.

Tidig resorption: Tecken på implantation utan ett igenkännbart embryo eller foster.

Sen resorption: Dött embryo eller foster med externa degenerativa förändringar.

NOAEL: Förkortning för ”no-observed-adverse-effect level” (nivå där inga skadliga verkningar observeras), dvs. den högsta dos- eller exponeringsnivå vid vilken inga skadliga behandlingsrelaterade verkningar kan observeras.

1.3 REFERENSÄMNE

Inga.

1.4 PRINCIP FÖR TESTMETODEN

Normalt tillförs testämnet till de dräktiga djuren minst från tidpunkten för implantationen till en dag före den planenliga avlivningsdagen. Den senare bör ligga så nära den normala nedkomstdagen som möjligt utan att det finns risk för att testdata går förlorade på grund av prematur nedkomst. Testmetoden är inte avsedd för undersökning enbart av organogenesperioden (t.ex. dag 5–15 hos gnagare och dag 6–18 hos kanin), utan även av verkningarna från tidpunkten för preimplantation (när det är tillämpligt) genom hela dräktighetsperioden fram till dagen före kejsarsnittet. Kort före kejsarsnittet avlivas hondjuren, livmoderinnehållet undersöks och fostren undersöks med avseende på externt observerbara anomalier och med avseende på mjukvävnads- och skelettavvikelser.

▼B

1.5 BESKRIVNING AV TESTMETODEN

1.5.1 **Val av djurart**

Det rekommenderas att testningen görs på de mest relevanta arterna, och att laboratoriearterna och stammarna är desamma som normalt används för testning av prenatal utvecklingstoxicitet. Rekommenderad gnagare är råtta och rekommenderad icke-gnagare är kanin. Om andra arter används måste detta motiveras.

1.5.2 **Förvarings- och utfodringsbetingelser**

Temperaturen i försöksdjurens rum bör vara 22 °C (± 3 °C) för gnagare och 18 °C (± 3 °C) för kaniner. Den relativa fuktigheten bör vara minst 30 % och helst inte överstiga 70 %, utom när rummet rengörs. Målvärdet bör dock vara 50–60 %. Belysningen bör vara artificiell med omväxlande 12 timmar ljus och 12 timmar mörker. För utfodringen kan konventionellt laboratoriefoder användas, och djuren bör ha obegränsad tillgång till dricksvatten.

För parningsprocedurerna används burar som är lämpliga för ändamålet. Även om individuell inhysning av parade djur är att rekommendera, godtas även inhysning i små grupper.

1.5.3 **Förberedelse av djuren**

För testet används friska djur som har acklimatiserats till laboratoriemiljön under minst fem dagar och som inte har använts för tidigare test. Försöksdjuren karakteriseras enligt art, stam, ursprung, kön, vikt och ålder. Djuren i alla testgrupper bör vara så lika som möjligt med avseende på vikt och ålder. För alla dosnivåer används unga vuxna hondjur som inte har fått ungar. Hondjuren bör paras med handjur av samma art och stam. Parning av syskon bör undvikas. För gnagare räknas dräktighetsdag 0 som den dag då en vaginalpropp eller sperma kan observeras. För kaniner räknas dag 0 i regel som dagen för coitus eller artificiell insemination, om sådan används. De parade hondjuren fördelas slumpmässigt i kontroll- och behandlingsgrupper. Burarna placeras i sådan ordning att eventuella verkningar på grund av placeringen minimeras. Varje djur förses med ett unikt identifieringsnummer. De parade hondjuren fördelas slumpmässigt i kontroll- och behandlingsgrupper. Om hondjuren paras i satser bör djuren i varje sats fördelas jämnt över grupperna. Likaså bör hondjur som har befruktats av samma handjur fördelas jämnt över grupperna.

1.6 FÖRFARANDE

1.6.1 **Djurens antal och kön**

Varje test- och kontrollgrupp bör innehålla ett tillräckligt antal hondjur för att det vid obduktionen ska finnas cirka 20 hondjur som har implantation. Grupper där mindre än 16 djur har implantation kan vara olämpligt. Mortalitet hos moderdjuren leder inte nödvändigtvis till att testet blir ogiltigt, förutsatt att mortaliteten inte överskrider cirka 10 %.

▼B

1.6.2 **Förberedelse av doserna**

Om vehikel eller någon annan tillsats används för att underlätta tillförseln bör följande beaktas: Verkningarna på absorption, distribution, metabolism och kvarhållande eller utsöndring av testämnet; verkningarna på testämnets kemiska egenskaper till den del dessa verkningar kan påverka testämnets toxiska egenskaper samt verkningarna på försöksdjurens foder- eller vattenintag eller deras näringstillstånd. Den vehikel som används får inte vara utvecklingstoxisk eller påverka reproduktionen.

1.6.3 **Dosering**

Testämnet bör i regel ges dagligen från och med implantationen (t.ex. dag 5 efter parningen) fram till dagen före det planenliga kejsarsnittet. Om preliminära test, i den mån sådana har gjorts, inte indikerar en hög potential för förluster före implantationen kan behandlingen förlängas till att omfatta hela dräktighets-perioden, från parningen till dagen före den planenliga avlivningen. Det är allmänt känt att olämplig hantering eller stress under dräktigheten kan leda till prenatala förluster. För att förebygga prenatala förluster på grund av faktorer som inte är behandlingsrelaterade bör onödig hantering av dräktiga djur undvikas. Likaså bör man undvika att utsätta sådana djur för stress på grund av externa faktorer såsom buller.

Minst tre dosnivåer och en parallell kontrollgrupp bör användas. Friska djur fördelas slumpmässigt i kontroll- och behandlingsgrupper. Dosnivåerna bör väljas så att en gradering av de toxiska effekterna erhålls. Såvida det inte finns några begränsningar till följd av testämnets fysikalisk-kemiska eller biologiska egenskaper bör den högsta dosen väljas så att den förväntas förorsaka en viss utvecklingstoxicitet och/eller toxiska verkningar på moderdjuret (kliniska tecken eller minskning av kroppsvikten), men inte död eller allvarligt lidande. Minst en av de mellanliggande dosnivåerna bör ge minsta möjliga observerbara toxiska verkningar. Den lägsta dosnivån bör inte ge några tecken på toxicitet hos moderdjuret eller utvecklingstoxicitet. Därefter väljs dosnivåerna i fallande skala så att en dosrelaterad reaktion kan påvisas. En nivå bör väljas så att inga påvisbara skadliga verkningar (NOAEL) uppstår. För fallande dosnivåer är två- till fyrfaldiga dosintervall ofta optimala. Tillägg av en fjärde testgrupp är att föredra framför användning av mycket breda intervall mellan dosnivåerna (t.ex. en faktor som är högre än cirka 6–10). Även om fastställandet av en NOAEL-nivå för moderdjuret är ett mål, kan även test där en sådan nivå inte fastställs vara godtagbara

Dosnivåerna bör väljas med hänsyn till alla kända toxicitetsuppgifter och all känd tilläggsinformation om metabolismen och de toxikokinetiska egenskaperna hos testämnet eller närbesläktade material. Denna information är också till hjälp när det gäller att demonstrera lämpligheten hos dossystemet.

En parallell kontrollgrupp bör användas. Kontrollgruppen ska vara en obehandlad grupp eller en vehikelkontrollgrupp, om vehikel används för tillförsel av testämnet. Alla grupper ges samma volym av testämnet eller vehikeln. Djuren i kontrollgruppen (kontrollgrupperna) bör hanteras på samma sätt som testgruppsdjuren. Vehikelkontrollgrupperna bör få vehikel i den största mängd som används (samma mängd som ges till den grupp som får den lägsta dosen).

▼B

1.6.4 **Gränstest (limit-test)**

Om ett test med en dosnivå om minst 1 000 mg oralt per kroppsvikt och dag genomförs på det sätt som beskrivs här, och inga toxiska verkningar kan observeras hos de dräktiga djuren eller deras avkomma, och om verkningar inte förväntas på grundval av kända data (t.ex. data om strukturellt eller metaboliskt närbesläktade ämnen), kan ett fullständigt test med tre dosnivåer bedömas vara överflödigt. Om det är sannolikt att människor kommer att utsättas för exponering måste eventuellt en högre oral dosnivå användas vid gränstestet. För andra former av tillförsel, såsom inandning eller applicering på huden, kan testämnets fysikalisk-kemiska egenskaper ofta indikera och begränsa den maximala exponeringsnivån (t.ex. applicering på huden får inte förorsaka allvarlig lokal toxicitet).

1.6.5 **Tillförsel av doser**

Testämnet eller vehikeln tillförs i regel oralt via intubation. Om någon annan tillförselväg används bör detta motiveras och det kan vara nödvändigt med tillämpliga modifikationer (2)(3)(4). Testämnet bör tillföras vid ungefär samma tid varje dag.

Dosen till individuella djur bör i regel basera sig på den senaste bestämningen av djurets kroppsvikt. Försiktighet bör dock iakttas när dosen justeras under dräktighetens sista tredjedel. Dosen bör väljas med hänsyn till kända data så att överdrivet kraftig toxicitet på moderdjuret kan undvikas. Om kraftig toxicitet ändå observeras på behandlade moderdjur bör dessa avlivas på ett humant sätt. Om flera dräktiga djur visar tecken på kraftig toxicitet bör man överväga att avsluta den dosgruppen. Om testämnet tillförs genom sondmatning rekommenderas att hela dosen tillförs på en gång via magsond eller lämplig intubationskanyl. Den största mängd vätska som kan tillföras vid ett och samma tillfälle beror på försöksdjurets storlek. Volymen får inte överstiga 1 ml per 100 g kroppsvikt, utom för vattenlösningar där volymen kan uppgå till 2 ml per 100 g kroppsvikt. Om majsolja används som vehikel får volymen inte överskrida 0,4 ml per 100 g kroppsvikt. Variationerna i testvolym bör minimeras genom att man justerar koncentrationerna så att en konstant volym kan säkerställas på alla dosnivåer.

1.6.6 **Observationer av moderdjuren**

Kliniska observationer bör göras och registreras minst en gång per dag, helst vid samma tid(er) varje dag. Tidpunkterna bör väljas med beaktande av perioden för när maximala verkningar förväntas efter dosering. Vid observationerna registreras djurens tillstånd (mortalitet, döende djur, relevanta beteendeändringar och alla tecken på uppenbar toxicitet).

1.6.7 **Kroppsvikt och foderkonsumtion**

Djuren bör vägas på dräktighetsdag 0 (eller inte senare än dräktighetsdag 3 om djuren kommer från en utomstående uppfödare hos vilken djuren har parats vid en viss tidpunkt), på den första doseringsdagen, därefter minst var tredje dag under doseringsperioden och till slut på den planenliga avlivningsdagen.

▼B

Foderkonsumtionen bör registreras med tre dagars intervall, på samma dagar som djuren vägs.

1.6.8 **Undersökning post-mortem**

Hondjuren avlivas en dag före den förväntade födslodagen. Hondjur som visar tecken på abort eller prematur födsel före den planenliga avlivningen bör avlivas och bli föremål för en grundlig makroskopisk undersökning.

Vid testets slut eller om djur dör under pågående test ska moderdjuret undersökas makroskopiskt med avseende på strukturella abnormaliteter eller patologiska förändringar. För att få en så hög grad av objektivitet som möjligt bör utvärderingen av moderdjuren under kejsarsnittet och fosteranalyserna helst göras utan kännedom om behandlingsgrupp.

1.6.9 **Undersökning av livmoderinnehåll**

Omedelbart efter testets slut eller så snart som möjligt efter ett dödsfall avlägsnas livmodern och djurens dräktighetsstatus fastställs. Om en livmoder inte har några tecken på dräktighet bör dess status bekräftas t.ex. genom ammoniumsulfidfärgning (för gnagare) eller Salewski-färgning eller någon annan lämplig metod (för kaniner) (5).

Varje dräktig livmoder vägs inklusive livmoderhals. Livmodern behöver inte vägas för djur som har självdött under testets gång.

För dräktiga djur fastställs antalet *corpora lutea*.

Livmoderinnehållet undersöks med avseende på eventuella döda embryon eller foster och antalet levande foster. Graden av resorption bör beskrivas i syfte att uppskatta den relativa tidpunkten för när conceptus har dött (se avsnitt 1.2).

1.6.10 **Undersökning av foster**

För varje foster fastställs kön och kroppsvikt.

Fostren undersöks för externa avvikelser (6).

Fostren undersöks också för avvikelser i skelettet och mjukdelarna (t.ex. variationer och missbildningar eller anomalier) (7)(8)(9)(10)(11)(12)(13)(14)(15)(16)(17)(18)(19)(20)(21)(22)(23)(24). Kategorisering av fosteravvikelserna rekommenderas, men krävs inte. Om kategorisering görs, bör kriterierna för definition av de olika kategorierna klart anges. Särskild uppmärksamhet bör fästas vid reproduktionsorganen, som ska undersökas för tecken på avvikande utveckling.

I fråga om gnagare förbereds cirka hälften av varje kull för undersökningar avseende avvikelser i skelettet. Återstoden förbereds och undersöks för avvikelser i mjukdelarna. För detta används godkända eller lämpliga metoder för seriell sektionering eller tekniker för noggrann dissektion.

▼B

I fråga om icke-gnagare, t.ex. kaniner, bör alla foster undersökas för avvikelser i både mjukdelarna och skelettet. Fosterkropparna dissekeras noggrant och utvärderas med avseende på avvikelser i mjukdelarna. Detta kan inbegripa procedurer för ytterligare utvärdering av den interna hjärtstrukturen (25). Från hälften av de foster som har undersökts på detta sätt avlägsnas huvudet och förbereds för utvärdering av avvikelser i mjukvävnad (ögon, hjärna, nasalpassager och tunga) med användning av normala seriella sektioneringsme-toder (26) eller någon annan lika känslig metod. Kropparna hos dessa foster och återstående intakta foster förbereds och undersöks för avvikelser i skelettet, med användning av samma metoder som har beskrivits för gnagare.

2. DATA

2.1 BEHANDLING AV RESULTATEN

Data rapporteras individuellt för moderdjuren och deras avkomma och sammanställs i en tabell. Tabellen ska för varje testgrupp visa antalet djur vid testets början, antalet djur som under testets gång har dött eller avlivats av humana skäl, tidpunkten för alla dödsfall eller humana avlivningar, antalet dräktiga hondjur, antalet djur som visat tecken på toxicitet, en beskrivning av observerade toxicitetstecken (tidpunkten då sådana först upptäcktes, de toxiska verkningarnas varaktighet och allvarlighetsgrad), typerna av observationer om embryon/foster och alla relevanta data om kullarna.

De numeriska resultaten utvärderas med en lämplig statistisk metod, med kullen som enhet för analysen av data. Den statistiska metod som används bör vara allmänt erkänd. Valet av statistiska metoder bör ingå som en del av testets utformning och bör motiveras. Rapporten bör även omfatta data om djur som inte överlever fram till den planenliga avlivningen. Sådana data kan, när det är relevant, inkluderas i gruppens medelvärden. Relevansen hos data från sådana djur bör motiveras och bedömas på individuell grund. Detsamma gäller för avgöranden om huruvida dessa data ska ingå i en grupps medelvärden eller inte.

2.2 UTVÄRDERING AV RESULTATEN

Resultaten från testet avseende prenatal utvecklingstoxicitet ska utvärderas med avseende på de observerade verkningarna. Utvärderingen bör omfatta följande information:

— Resultaten från test på moderdjur och embryo/foster, inbegripet en utvärdering av förhållandet (eller avsaknaden av ett förhållande) mellan djurens exponering för testämnet och förekomsten av och allvarligheten hos alla fynd.

— Kriterier som används för att kategorisera avvikelser på fostret (externt, mjukvävnad och skelett), om kategorisering har gjorts.

▼B

— I tillämpliga fall historiska kontrolldata som stöd för tolkningen av resultaten.

— De antal som har använts vid beräkning av procenttal eller index.

— I tillämpliga fall adekvat statistisk analys av testresultaten. En sådan analys bör inbegripa tillräcklig information om analysmetoden så att en oberoende granskare eller statistiker kan göra en ny utvärdering och rekonstruera analysen.

Om utfallet tyder på frånvaro av toxiska verkningar bör ytterligare undersökningar för att fastställa testämnets absorption och biotillgänglighet övervägas.

2.3 TOLKNING AV RESULTATEN

Ett test avseende prenatal utvecklingstoxicitet ger information om verkningarna av upprepad exponering för ett ämne på moderdjuren under dräktigheten och på avkommans utveckling inne i livmodern. Testresultaten ska tolkas tillsammans med resultaten från test avseende subkronisk toxicitet, reproduktionstoxi-citet, toxikokinetik och andra test. Eftersom betoning läggs både vid endpointen för allmän toxicitet uttryckt som toxicitet för moderdjuret och vid endpointen för utvecklingstoxicitet, ger testresultatet en viss möjlighet till diskriminering mellan verkningar på utvecklingen i frånvaron av allmän toxicitet och verkningar som endast induceras på nivåer som även är toxiska för moderdjuret (27).

3. RAPPORTERING

3.1 TESTRAPPORT

Testrapporten ska innehålla nedan angivna specifika uppgifter.

Testämne:

— Fysikalisk natur och, när det är relevant, fysikalisk-kemiska egenskaper.

— Identifikation inklusive CAS-nummer, om detta är känt/fastställt.

— Renhetsgrad.

Vehikel (i förekommande fall):

— Motivering för val av vehikel, om annan än vatten.

Försöksdjur:

— Art och stam som använts.

— Djurens antal och kön.

— Ursprung, förvaringsbetingelser, foder osv.

— Djurens individuella vikt vid testets början.

Testbetingelser:

— Motivering för val av dosnivåer.

— Utförliga uppgifter om testämnets sammansättning och beredning av fodret, uppnådd koncentration, preparatets stabilitet och homogenitet.

▼B

— Utförliga uppgifter om hur testämnet har tillförts.

— Omräkning av testämneskoncentrationen i foder eller vatten (ppm) till faktisk dos (mg per kg kroppsvikt och dag), om tillämpligt.

— Miljöbetingelser.

— Uppgifter om foder- och vattenkvalitet.

Resultat:

Data om moderdjurens toxicitetsrespons, inklusive men inte begränsat till följande:

— Antalet djur vid testets början, antalet överlevande djur, antalet dräktiga djur, antalet djur som haft abort och antalet djur med prematur födsel.

— Tidpunkten (dag) för dödsfall under testets gång och huruvida djuren överlevde till testets slut.

— Data om djur som inte överlevde till den planenliga avlivningen bör rapporteras, men inte inkluderas i de statistiska jämförelserna mellan grupper.

— Dagen för observation av varje abnormalt kliniskt tecken och dess fortsatta förlopp.

— Kroppsvikt, kroppsviktsförändringar och livmoderns dräktighetsvikt, inklusive (om så önskas) kroppsviktsförändringar justerade för livmoderns dräktighetsvikt.

— Foderkonsumtion och, om uppmätt, vattenkonsumtion.

— Obduktionsresultat, inklusive livmoderns vikt.

— NOAEL-värden för verkningar på moderdjuren och på utvecklingen bör rapporteras.

”Endpoints” för utvecklingen per dos för kullar med implantation, inklusive följande:

— Antalet *corpora lutea*.

— Antalet implantationer, antalet och procentandelen levande och döda foster samt antalet resorptioner.

— Antalet och procentandelen förluster före och efter implantation.

”Endpoints” för utvecklingen per dos för kullar med levande foster, inklusive följande:

— Antalet och procentandelen levande avkomma.

— Kvoten mellan könen.

— Fostrens kroppsvikt, helst per kön och för båda könen kombinerat.

— Missbildningar (externt, mjukvävnad och skelett) och andra relevanta avvikelser.

— Kriterier för kategorisering, i tillämpliga fall.

▼B

— Totalantalet och procentandelen foster och kullar med avvikelser (externa, mjukvävnad eller skelett) samt typen och förekomsten av individuella anomalier och andra relevanta avvikelser.

Diskussion om resultaten.

Slutsatser.

4. **HÄNVISNINGAR**

1. Kavlock R.J. *et al.* (1996) A Simulation Study of the Influence 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 Toxicology* 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-Specific Organ/Tissue Toxicity, 40 CFR 798.4350: Inhalation Developmental Toxicity Study.

5. Salewski, E. (1964) Faerbermethode zum Makroskopischen Nachweis von Implantations Stellen am Uterusder Ratte. *Naunyn-Schmeidebergs Archiv fur Pharmakologie und Experimentelle 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) Differential Staining of Cartilage and Bone in Fetal Mouse Skeleton by Alcian Blue and Alizarin Red S. *Congenital Anomalies* 16; 171–173.

8. Igarashi, E. *et al.* (1992) Frequency Of Spontaneous Axial Skeletal Variations Detected by the Double Staining Techniquefor 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. *Stain 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, IL.

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, E.B. and C.G. Bennett (1977) A Dissecting 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, IL, 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 KARCINOGENICITETSSTUDIER

INLEDNING

1. Den här testmetoden motsvarar OECD:s testriktlinje (TG) 451 (2009). Den ursprungliga TG 451 om karcinogenicitetsstudier antogs 1981. Utvecklingen av denna reviderade testmetod B.32 ansågs nödvändig för att återspegla den senaste utvecklingen inom djurskydd och myndighetskrav (2) (3) (4) (5) (6). Uppdateringen av denna testmetod B.32 har genomförts parallellt med revideringen av kapitel B.30 i denna bilaga, kroniska toxicitetsstudier, och kapitel B.33 i denna bilaga, kombinerad kronisk toxicitet/karcinogenicitetsstudie i syfte att erhålla ytterligare information om djuren som används i studien och ge ytterligare detaljer om val av dos. Den här testmetoden B.32 är avsedd att användas vid testning av ett brett spektrum av kemikalier, inklusive bekämpningsmedel och industrikemikalier. Det bör påpekas att vissa detaljer och krav kan variera för läkemedel (se internationella konferensen om harmonisering (ICH) vägledning S1B om testning av cancerframkallande läkemedel).

2. Majoriteten av karcinogenicitetsstudier genomförs med gnagare, och den här testmetoden är främst avsedd för studier som genomförs med dessa arter. Skulle sådana studier krävas för icke-gnagare, bör de principer och förfaranden som beskrivs i denna testmetod tillsammans med dem som anges i kapitel B.27 i denna bilaga, 90-dagars toxicitetsstudie med upprepad oral dosering med icke-gnagare (6) tillämpas, med lämpliga modifieringar. Ytterligare vägledning finns i OECD:s vägledningsdokument nr 116 om utformning och genomförande av kroniska toxicitets- och karcinogenicitetsstudier (7).

3. De tre huvudsakliga administreringssätten som används i karcinogenicitetsstudier är oral, dermal och inhalation. Valet av administreringssätt beror på de fysikaliska och kemiska egenskaperna hos testkemikalien och det dominerande exponeringssättet för människor. Ytterligare information om val av exponeringssätt ges i vägledningsdokument nr 116 (7).

4. Den här testmetoden fokuserar på exponering via oralt intag, det intag som används mest i karcinogenicitetsstudier. Även om karcinogenicitetsstudier som medför exponering via huden eller inhalation kan vara nödvändiga för riskbedömning av människors hälsa och/eller kan krävas under vissa regelverk, innebär båda exponeringsvägarna en betydande teknisk komplexitet. Sådana studier måste utformas från fall till fall, även om testmetoden som beskrivs här för bedömningen och utvärderingen av karcinogenicitet skulle kunna utgöra grunden för ett protokoll för inhalations- och/eller hudstudier, med hänsyn tagen till rekommendationer om behandlingsperioder, kliniska eller patologiska parametrar etc. OECD:s vägledning finns tillgänglig om administrering av testkemikalier via huden (7) och genom inhalation (7) (8). Kapitel B.8 i denna bilaga (9) och kapitel B.29 i denna bilaga (10), tillsammans med OECD:s vägledningsdokument om akut inhalationstestning (8), bör särskilt rådfrågas vid utformningen av långsiktiga studier som inbegriper exponering via inhalation. Kapitel B.9 i denna bilaga (11) bör rådfrågas när det gäller testning som utförs via huden.

▼M4

5. Studien om karcinogenicitet ger information om möjliga hälsofaror som sannolikt kan uppstå vid upprepad exponering under en period som varar upp till hela livslängden för de arter som används. Studien kommer att ge information om de toxiska effekterna hos testkemikalien inklusive potentiell karcinogenicitet, samt indikation om målorgan och möjlig ackumulering. Den kan ge en uppskattning av den icke-observerade nivån för skadliga biverkningar och, i fallet med icke-genotoxiska karcinogener, för tumörresponser som kan användas för att fastställa säkerhetskriterier för exponering av människor. Behovet av noggranna kliniska observationer av djuren i syfte att få fram så mycket information som möjligt betonas också.

6. Målen för karcinogenicitetsstudier som omfattas av denna testmetod inkluderar:

— Identifieringen av de cancerframkallande egenskaperna hos en testkemikalie, vilket leder till en ökad incidens av tumörer, ökad andel av maligna tumörer eller en minskning av tiden till uppkomsten av tumörer, jämfört med parallella kontrollgrupper.

— Identifieringen av målorgan för karcinogenicitet.

— Fastställandet av tiden till uppkomst av tumörer.

— Karakterisering av förhållandet tumör-dosrespons.

— Identifieringen av nivån där ingen skadlig effekt observeras (NOAEL) eller utgångspunkten för upprättandet av en referensdos (BMD).

— Framtida konsekvenser av karcinogena effekter vid mänsklig exponering för lågdosnivåer.

— Tillhandahållande av data för att testa hypoteser om verkningssätt (2) (7) (12) (13) (14) (15).

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN

7. Vid bedömningen och utvärderingen av den potentiella karcinogeniciteten hos en testkemikalie bör all tillgänglig information om testkemikalien beaktas av testlaboratoriet innan studien genomförs, i syfte att fokusera på utformningen av studien för att mer effektivt testa den karcinogena potentialen och minimera användningen av djur. Information om, och hänsyn till, verkningsmekanismen hos ett cancerframkallande ämne (2) (7) (12) (13) (14) (15) är särskilt viktig, eftersom den optimala utformningen kan variera beroende på om testkemikalien är en känd eller misstänkt genotoxisk karcinogen. Ytterligare vägledning om beaktande av verkningssätt finns i vägledningsdokument nr 116 (7).

8. Information som underlättar studiens utformning inkluderar identitet, kemisk struktur, och fysikalisk-kemiska egenskaper hos testkemikalien, resultat från eventuella in vitro- eller in vivo-genotoxicitetstester; förväntad(e) användning(ar) och risken för mänsklig exponering, tillgängliga (Q)SAR-data, mutagenicitet/genotoxicitet, karcinogenicitet och toxikologiska data om strukturellt närbesläktade kemikalier, tillgängliga toxikokinetiska data (engångsdos- och upprepad dos-kinetik om det finns tillgängligt) och data från andra studier med upprepad exponering. Bedömning av kronisk toxicitet bör

▼M4

utföras efter att inledande information om toxicitet har erhållits från 28-dagars och/eller 90-dagars toxicitetstester med upprepad dosering. Kortsiktiga initieringsfrämjande cancertester kan också ge användbar information. Ett stegvist förhållningssätt till testning av karcinogenicitet bör betraktas som en del av den övergripande bedömningen av de potentiella hälsoeffekterna för en viss testkemikalie (16) (17) (18) (19).

9. De statistiska metoder som är mest lämpade för analys av resultaten, med tanke på försöksutformningen och målen, bör fastställas innan studien påbörjas. Frågor att överväga inkluderar huruvida statistiken bör innefatta justering av överlevnad, analys av kumulativa tumörrisker i förhållande till överlevnadsvaraktighet, analys av tiden till tumören och analys i händelse av förtida terminering av en eller fler grupper. Vägledning om lämpliga statistiska analyser och viktiga referenser till internationellt erkända statistiska metoder ges i vägledningsdokument nr 116 (7), samt i vägledningsdokument nr 35 om analys och utvärdering av studier över kronisk toxicitet och karcinogenicitet (20).

10. Vid genomförandet av en studie om karcinogenicitet bör man alltid följa de vägledande principer och överväganden som beskrivs i OECD:s vägledningsdokument nr 19 om erkännande, bedömning och användning av kliniska tecken som humana endpoints för försöksdjur som används i säkerhetsbedömningen (21). Se särskilt punkt 62. Detta avsnitt anger att ”I studier med upprepad dosering när ett djur visar kliniska tecken som är progressiva, vilket leder till ytterligare försämring av tillståndet, bör ett välgrundat beslut tas om man ska eller inte ska avliva djuret av humanitära skäl. Beslutet bör även omfatta övervägandet av värdet av informationen som fås genom fortsatt skötsel av det djuret i studien i förhållande till dess övergripande tillstånd. Om ett beslut har tagits att låta djuret kvarstå i testet, bör observationsfrekvensen ökas vid behov. Det är också möjligt, utan att allvarligt påverka syftet med testet, att tillfälligt upphöra med doseringen om det kan minska smärtan eller lidandet, eller att minska testdosen.”

11. Detaljerad vägledning om och diskussion av principerna för valet av dos för studier om kronisk toxicitet och karcinogenicitet finns i vägledningsdokument nr 116 (7) samt i två internationella publikationer från Life Sciences Institute (22) (23). Den centrala strategin för valet av dos är beroende av det primära målet eller målen med studien (punkt 6). Vid val av lämpliga dosnivåer bör en balans uppstå mellan faroundersökning å ena sidan och karakterisering av lågdosresponser och deras betydelse på den andra. Detta är särskilt relevant i en situation där en kombinerad studie av kronisk toxicitet och karcinogenicitet (kapitel B.33 i denna bilaga) genomförs (punkt 12).

12. Man bör överväga att genomföra en kombinerad studie av kronisk toxicitet och karcinogenicitet (kapitel B.33 i denna bilaga), snarare än ett separat utförande av en studie av kronisk toxicitet (kapitel B.30 i denna bilaga) och en studie av karcinogenicitet (denna testmetod B.32). Det kombinerade testet ger större effektivitet vad gäller tid och kostnad jämfört med att jämföra två separata studier, utan att man kompromissar med datans kvalitet i antingen den kroniska eller karcinogena fasen. Noggrant övervägande bör dock ges för principerna av valet av dos (punkterna 11 och 22–25) vid en kombinerad studie av kronisk toxicitet och karcinogenicitet (kapitel B.33 i denna bilaga), och det är också erkänt att separata studier kan krävas under vissa regelverk.

▼M4

13. Definitioner som används inom ramen för den här metoden finns i slutet av det här kapitlet och i vägledningsdokumentet nr 116 (7).

PRINCIP FÖR TESTMETODEN

14. Testkemikalien administreras dagligen i graderade doser till flera grupper av försöksdjur för huvuddelen av deras livslängd, normalt via oralt intag. Testning genom inhalation eller via huden kan också vara lämpligt. Djuren observeras noggrant avseende tecken på toxicitet och för utvecklingen av neoplastiska skador. Djur som dör eller avlivas under testet obduceras, och i slutet av testet avlivas överlevande djur och obduceras.

BESKRIVNING AV METOD

Val av djurart

15. Den här testmetoden täcker främst bedömning och utvärdering av karcinogenicitet hos gnagare (punkt 2). Användningen av icke-gnagare kan övervägas när tillgängliga data tyder på att de är mer relevanta för förutsägelser av hälsoeffekter på människor. Valet av art bör motiveras. Rekommenderad gnagare är råtta, även om andra gnagare t.ex. mus kan användas. Även om användningen av möss i karcinogenicitetstester kan ha begränsad användbarhet (24) (25) (26), krävs fortfarande karcinogenicitetstester med möss under några aktuella regelverk såvida det inte kan fastställas att en sådan studie inte är vetenskapligt nödvändig. Råttor och möss har föredragits på grund av deras relativt korta livslängd, deras breda användning i farmakologiska och toxikologiska studier, deras känslighet för tumörinduktion och tillgången på stammar som beskrivits tillräckligt ingående. Som en följd av dessa egenskaper finns en stor mängd information tillgänglig om deras fysiologi och patologi. Ytterligare information om val av arter och stam ges i OECD:s vägledningsdokument nr 116 (7).

16. I testet bör unga friska vuxna djur användas av stammar som vanligtvis används på laboratorier. Karcinogenicitetsstudien bör helst utföras på djur från samma stam och ursprung som de som användes i den inledande toxicitetsstudien(erna) med kortare varaktighet, dock, om djur från samma stam och ursprung är kända för att ge problem med att uppnå det normalt accepterade kriteriet för överlevnad i långsiktiga studier (se vägledningsdokument nr 116 (7)), bör man överväga att använda en stam med acceptabel överlevnadsgrad för den långsiktiga studien. Honorna ska inte ha fått ungar och inte vara dräktiga.

Inhysning och utfodring

17. Djuren kan inhysas individuellt, eller i små grupper av samma kön; individuell inhysning ska endast övervägas om det är vetenskapligt motiverat (27) (28) (29). Burarna bör placeras så att en möjlig påverkan beroende på deras placering minimeras. Temperaturen i försöksdjurens utrymmen bör vara 22 °C (± 3 °C). Den relativa fuktigheten bör vara minst 30 % och helst inte överstiga 70 % utom när rummet rengörs, och målet bör vara 50–60 %. Belysningen bör vara artificiell, med omväxlande 12 timmar ljus och 12 timmar mörker. För utfodringen kan konventionellt laboratoriefoder användas med ett obegränsat utbud av dricksvatten. Kosten ska uppfylla alla näringsmässiga krav för arterna som testas och innehållet av föroreningar i kosten som kan påverka testresultatet inkluderar, men är ej

▼M4

begränsade till, bekämpningsmedelsrester, långlivade organiska föroreningar, fytoöstrogener, tungmetaller och mykotoxiner, och bör vara så låga som möjligt. Analytisk information om närings- och kostföroreningsnivåer bör genereras periodiskt, åtminstone i början av studien och när det finns en förändring i det använda partiet, och bör ingå i den slutliga rapporten. Analytisk information om dricksvattnet som används i studien ska likaledes ingå. Valet av foder kan påverkas av behovet av att säkerställa en lämplig blandning av en testkemikalie och för att tillgodose djurens näringsbehov när testkemikalien tillförs genom kosten.

Förberedelse av djuren

18. Friska djur, som har acklimatiserat sig till laboratoriets betingelser i minst 7 dagar och inte tidigare har ingått i försök, ska användas. När det gäller gnagare bör doseringen av djuren påbörjas snarast möjligt efter avvänjning och acklimatisering, och helst innan djuren är 8 veckor gamla. Försöksdjuren bör karakteriseras efter art, stam, ursprung, kön, vikt och ålder. Vid undersökningens början bör viktvariationen hos varje kön vara minimal och inte överstiga ± 20 % av medelvikten för alla djur inom studien, separat för varje kön. Djuren fördelas slumpvis i kontroll- och behandlingsgrupperna. Efter randomiseringen bör det inte finnas några signifikanta skillnader i genomsnittliga kroppsvikter mellan grupper inom varje kön. Om det finns statistiskt signifikanta skillnader, bör randomiseringssteget upprepas, om möjligt. Varje djur bör tilldelas ett unikt identifikationsnummer, och märkas permanent med detta nummer genom tatuering, mikrochipimplantat, eller med annan lämplig metod.

PROCEDUR

Djurens antal och kön

19. Bägge könen ska användas. Ett tillräckligt antal djur ska användas så att en grundlig biologisk och statistisk utvärdering är möjlig. Varje dosgrupp och parallell kontrollgrupp bör därför innehålla minst 50 djur av vardera könet. Beroende på syftet med studien finns det möjlighet att öka den statistiska giltigheten för de viktigaste uppskattningarna genom att fördela djuren ojämnt till de olika dosgrupperna, med t.ex. fler än 50 djur i lågdosgruppen, för att uppskatta den cancerframkallande potentialen vid låga doser. Det ska dock erkännas att en måttlig ökning av gruppstorlek ger en relativt liten ökning av den statistiska giltigheten för studien. Ytterligare information om statistisk utformning av studien och val av dosnivåer för att maximera den statistiska giltigheten finns i vägledningsdokument nr 116 (7).

Avsättningar för avlivningar och satellitgrupper (kontroll)

20. Studien får föreskriva avlivningar t.ex. efter 12 månader för att få information om framskridandet av neoplastiska förändringar och mekanistisk information, om det är vetenskapligt motiverat. Om sådan information om testkemikalien redan finns tillgänglig från tidigare toxicitetsstudier med upprepad dosering kanske inte avlivningar är vetenskapligt motiverade. Om avlivning är inkluderad i studien, kommer antalet djur i varje dosgrupp som planeras att avlivas normalt vara 10 djur per kön, och det totala antalet djur som ingår i studiens utformning ska ökas med det antal djur som avlivas innan studien slutförs. Ytterligare en grupp kontrolldjur (normalt 5 djur per kön) kan ingå för övervakning av sjukdomsstatus under studien (30), om nödvändigt. Mer vägledning finns i vägledningsdokument nr 116 (7).

▼M4

Dosgrupper och dosering

21. Vägledning över alla aspekter av valet av dos och dosnivå finns i vägledningsdokument nr 116 (7). Minst tre dosnivåer och en parallell kontroll ska användas. Dosnivåer grundas i allmänhet på resultaten från en korttidsstudie med upprepad dosering eller en spännviddsstudie och bör beakta eventuella toxikokinetiska data som finns tillgängliga om testkemikalien eller närbesläktade kemikalier.

22. Såvida den inte är begränsad genom testkemikaliens fysikalisk-kemiska natur eller biologiska verkningar, bör den högsta dosnivån väljas för att identifiera de viktigaste målorganen och de toxiska effekterna, samtidigt som man undviker lidande, svår toxicitet, sjuklighet eller död. Samtidigt som man tar hänsyn till de faktorer som anges nedan i punkt 23, ska den högsta dosnivån väljas för att framkalla tecken på toxicitet, vilket framgår av till exempel en sänkning av kroppsviktsökningen (ca 10 %). Dock kan man beroende på målen för studien (se punkt 6), välja en toppdos lägre än den dos som ger tecken på toxicitet, t.ex. om en dos framkallar en negativ effekt som har liten eller ingen påverkan på livslängd eller kroppsvikt.

23. Dosnivåer och dosnivåspridning kan väljas för att etablera en dosrespons och, beroende på testkemikaliens verkningssätt, en NOAEL eller andra avsedda resultat från studien t.ex. en BMD (se punkt 25) för den lägsta dosnivån. Faktorer som bör beaktas i placeringen av lägre doser inkluderar den förväntade lutningen för dosrespons-kurvan, de doser vid vilka viktiga förändringar kan uppstå i metabolismen eller den toxiska verkningens art, där ett tröskelvärde förväntas eller där en utgångspunkt för lågdosextrapolering förväntas.

24. Den dosnivåspridning som väljs beror på testkemikaliens egenskaper och kan inte föreskrivas i denna testmetod, men två- till fyrfaldiga dosintervall ger ofta bra testprestanda för att fastställa fallande dosnivåer, och tillägg av en fjärde testgrupp är att föredra framför användningen av mycket stora intervall (t.ex. mer än en faktor på ca 6–10) mellan doseringarna. I allmänhet bör användningen av faktorer som är större än 10 undvikas, och ska motiveras om de används.

25. Såsom diskuteras vidare i vägledningsdokument nr 116 (7), inkluderar punkter som ska beaktas vid val av dos:

— Kända eller misstänkta olinjäriteter eller inflexionspunkter i dosresponsen.

— Toxikokinetik och dosintervall där metabolisk induktion, mättnad eller olinjäritet mellan externa och interna doser uppträder eller ej.

— Utgångsskador, markörer för verkan eller indikatorer för viktiga underliggande biologiska processer.

— Nyckelaspekter (eller misstänkta sådana) för verkningsmekanismer, såsom doser vid vilka cytotoxicitet börjar uppstå, hormonnivåerna störs, homeostatiska mekanismer är överväldigande etc.

▼M4

— Områden i dosrespons-kurvan där en särskilt stabil uppskattning behövs, t.ex. intervallet för förväntad BMD eller ett misstänkt tröskelvärde.

— Beaktande av förväntade exponeringsnivåer för människor.

26. Kontrollgruppen ska vara en obehandlad grupp eller en vehikelkontrollgrupp, om en vehikel används för tillförsel av testkemikalien. Med undantag av behandlingen med testkemikalien, bör djuren i kontrollgruppen hanteras på exakt samma sätt som de i testgrupperna. Om en vehikel används ska kontrollgruppen tillföras vehikeln i den största volym som används bland dosgrupperna. Om en testkemikalie tillförs via kosten och förorsakar ett betydligt minskat intag på grund av mindre välsmakande kost, kan ytterligare en parutfodrad kontrollgrupp vara användbar för en lämpligare kontroll.

Beredning av doser och administrering av testkemikalie

27. Testkemikalien tillförs vanligtvis oralt, via kosten eller dricksvattnet, eller genom sondmatning. Ytterligare information om vägar och metoder för administrering ges i OECD:s vägledningsdokument nr 116 (7). Vägen och metoden för administrering beror på syftet med studien, de fysikalisk-kemiska egenskaperna hos testkemikalien, dess biotillgänglighet och dominerande väg och metod för exponering av människor. En motivering bör ges för vald väg och metod för administrering. Med tanke på djurskydd bör oral sondmatning normalt väljas endast för de ämnen för vilka denna väg och metod för administrering representerar en potentiell mänsklig exponering (t.ex. läkemedel). För kost- eller miljökemikalier inklusive bekämpningsmedel, sker administrering vanligtvis via foder eller dricksvatten. För några situationer, t.ex. arbetsrelaterad exponering, kan administrering via andra vägar vara lämpligare.

28. Vid behov kan testkemikalien upplösas eller suspenderas i en lämplig vehikel. Hänsyn bör tas till följande egenskaper hos vehikeln och andra tillsatsämnen, i förekommande fall: verkningar på absorption, distribution, metabolism eller retention av testkemikalien, verkningar på testkemikaliens kemiska egenskaper som kan förändra dess toxiska egenskaper samt påverkan på foder- eller vattenkonsumtion, eller djurens nutritionsstatus. Det rekommenderas, när så är möjligt, att man först använder en vattenbaserad lösning/suspension följt av en lösning/emulsion i olja (t.ex. majsolja) och därefter eventuell lösning i andra vehiklar. För andra vehiklar än vatten bör de toxiska egenskaperna hos vehikeln vara kända. Information om testkemikaliens stabilitet och doseringslösningarnas eller fodrets homogenitet (i förekommande fall) enligt villkoren för administreringen (t.ex. kost), bör finnas tillgänglig.

29. För kemikalier som tillförs via foder eller dricksvatten är det viktigt att säkerställa att kvantiteterna av den berörda testkemikalien inte påverkar normal närings- eller vattenbalans. I långtidsstudier med kostadministrering bör koncentrationen av testkemikalien i fodret normalt inte överskrida en övre gräns på 5 % av den totala kosten, för att undvika näringsmässig obalans. När testkemikalien tillförs via kosten, kan antingen en konstant foderkoncentration (mg/kg foder eller ppm) eller en konstant dosnivå i förhållande till djurens kroppsvikt (mg/kg kroppsvikt), beräknad på veckobasis, användas. Det alternativ som används ska anges.

▼M4

30. Vad gäller oral administrering doseras djuren med testkemikalien dagligen (sju dagar per vecka), vanligtvis under en period på 24 månader för gnagare (se också punkt 32). Alla andra doseringsscheman, t.ex. fem dagar per vecka, måste motiveras. När det gäller dermal administrering behandlas djuren normalt med testkemikalien minst 6 timmar per dag, 7 dagar per vecka enligt kapitel B.9 i denna bilaga (11) under en period av 24 månader. Exponering genom inhalation utförs 6 timmar per dag, 7 dagar per vecka, men exponering 5 dagar per vecka kan också användas om detta är motiverat. Exponeringsperioden är normalt en period på 24 månader. Om andra gnagare än råttor utsätts för enbart nos, kan de maximala exponeringstiderna justeras för att minska artspecifikt lidande. En motivering bör ges när man använder en exponeringstid kortare än 6 timmar per dag. Se också kapitel B.8 i denna bilaga (9).

31. När en testkemikalie administreras via sondmatning bör detta ske via en magsond eller en lämplig intubationskanyl vid ungefär samma tid varje dag. Normalt administreras en engångsdos en gång per dag, men om en kemikalie är lokalt irriterande är det möjligt att upprätthålla den dagliga dosen genom delad dos (två gånger per dag). Den största mängd vätska som kan administreras vid ett tillfälle beror på försöksdjurets storlek. Volymen bör vara så liten som möjligt, och bör normalt inte överstiga 1 ml/100 g kroppsvikt för gnagare (31). Variationer i testvolym bör minimeras genom justering av koncentrationen för att säkerställa en konstant volym vid alla dosnivåer. Potentiellt frätande eller irriterande kemikalier är undantagna, och måste spädas ut för att allvarliga lokala verkningar ska kunna undvikas. Testning vid koncentrationer som sannolikt är frätande eller irriterande för magtarmkanalen bör undvikas.

Studiens varaktighet

32. Studiens varaktighet är normalt 24 månader för gnagare, vilket motsvarar huvuddelen av livslängden för de djur som används. Kortare eller längre varaktigheter kan användas, beroende på livslängden för djurarten i studien, men bör motiveras. För specifika stammar av möss t.ex. AKR/J-, C3H/J- eller C57BL/6J-stammar kan en varaktighet på 18 månader vara mer lämplig. Det följande ger viss vägledning avseende varaktighet, studiens upphörande och överlevnad, ytterligare riktlinjer som inbegriper en bedömning av huruvida en negativ karcinogenicitet förhåller sig till överlevnad i studien ges i OECD:s vägledningsdokument nr 116 om utformning och genomförande av studier om kronisk toxicitet och karcinogenicitet (7).

— Studiens upphörande bör beaktas när antalet överlevare i de lägre dosgrupperna understiger 25 procent.

— I de fall där endast högdosgruppen dör i förtid på grund av toxicitet bör detta inte leda till upphörande av studien.

— Överlevnad för vardera kön ska beaktas för sig.

— Studien bör inte fortsätta över den punkt där tillgängliga data från studien inte längre är tillräckliga för att ge en statistisk giltig utvärdering.

▼M4

IAKTTAGELSER

33. Samtliga djur bör observeras beträffande sjuklighet eller mortalitet, vanligtvis i början och slutet av varje dag, inklusive helger och helgdagar. Djuren bör dessutom kontrolleras en gång per dag för särskilda tecken med toxikologisk relevans, med beaktande av maximalt förväntade effekter efter dosering med sondmatning. Särskild uppmärksamhet bör ges åt tumörutveckling och tidpunkten för tumörens uppkomst, plats, mått, utseende, och utvecklingen av varje tydlig eller kännbar tumör ska registreras.

Kroppsvikt, foder-/vattenkonsumtion och fodereffektivitet

34. Samtliga djur bör vägas vid behandlingens början, minst en gång i veckan de första 13 veckorna och därefter minst en gång per månad. Mätningar av foderkonsumtion och fodereffektivitet bör minst göras varje vecka de 13 första veckorna och därefter minst en gång per månad. Vattenkonsumtionen bör mätas minst en gång per vecka de 13 första veckorna, och därefter minst en gång per månad, när testkemikalien administreras via dricksvattnet. Mätningar av vattenkonsumtionen bör också övervägas för studier där vattendrickandet förändras.

Hematologiska, kliniska biokemiska och andra mätningar

35. För att maximera informationen som erhållits från studien, särskilt överväganden gällande verkningssätt, kan blodprover tas för hematologi och klinisk biokemi, och detta efter bedömning av försöksledaren. Urinanalys kan även vara lämplig. Ytterligare vägledning om värdet med att ta sådana prov som en del av en karcinogenicitetsstudie finns i vägledningsdokument nr 116 (7). Om det anses lämpligt kan blodprov för hematologiska och kliniska biokemiska bestämningar och urinanalys utföras som en del i en avlivning (punkt 20) och vid studiens slut på minst 10 djur per kön och grupp. Blodprover bör tas under narkos från ett angivet ställe, till exempel genom hjärtpunktering eller från retro-orbitalsinus under narkos, och lagras, om tillämpligt, under lämpliga förhållanden. Blodutstryk kan också beredas för undersökning, särskilt om benmärgen verkar vara målorganet, även om värdet av en sådan undersökning för bestämning av karcinogen/onkogen potential har ifrågasatts (32).

PATOLOGI

Obduktion

36. Samtliga djur i studien med undantag av kontrolldjur (se punkt 20) och andra satellitgrupper, bör underkastas en fullständig obduktion som omfattar omsorgsfull granskning av kroppens yttre ytor, alla kroppsöppningar samt kranium, bröst- och bukhåla och deras innehåll. Obduktion kan från fall till fall krävas av indikatordjur och andra satellitdjur efter beslut av försöksledaren. Organvikter är normalt inte en del av en karcinogen studie, eftersom geriatriska förändringar och, i senare skeden, utvecklingen av tumörer förvirrar användbarheten av organviktsdatan. De kan dock vara avgörande för att göra en sammanvägd bedömning, och särskilt för överväganden beträffande verkningssätt. Om de är en del av en satellitstudie bör de inte samlas in senare än ett år efter studiens inledning.

▼**M4**

37. Följande vävnader bör bevaras i det mest lämpade fixeringsmedlet för både vävnadstypen och den planerade efterföljande histopatologiska undersökningen (33) (vävnader inom hakparenteser är valfria):

alla större skador	hjärta	pankreas	mage (förmagen, glandulärmagen)
binjure	ileum	bisköldkörtel	[tänder]
aorta	jejunum	perifer nerv	testikel
hjärna (inklusive delar av cerebrum, cerebellum och medulla/pons)	njure	hypofys	tymus
cekum	tårkörtel (exorbital)	prostata	sköldkörtel
cervix	lever	rektum	[tunga]
koagulerande körtel	lunga	spottkörtel	trakea
kolon	lymfkörtlar (både ytliga och djupa)	sädesblåsa	urinblåsa
tolvfingertarm	bröstkörtel (obligatorisk för honor, och om synlig och dissekeringsbar hos hanar)	skelettmuskel	uterus (inklusive cervix)
bitestikel	[övre luftvägarna, inklusive nos, turbinates och bihålorna]	hud	[ureter]
öga (inklusive näthinna)	esofagus	ryggmärg (på tre nivåer: cervikal, mitt på bröstkorgen och ländryggen)	[uretra]
[lårben med led]	[luktbulb]	mjälte	vagina
gallblåsa (för andra arter än råtta)	äggstock	[bröstben],	snitt av ryggmärgen och/eller ett färskt benmärgsaspirat
Harderiankörtel			

När det gäller parvisa organ t.ex. njure, binjure, bör båda organen bevaras. Kliniska och andra fynd kan indikera behovet av att undersöka ytterligare vävnader. Alla organ som sannolikt är målorgan, baserat på kunskap om testkemikaliens egenskaper, ska också konserveras. I studier som inbegriper administrering via huden bör organen som anges för oralt intag bevaras, och det är viktigt med särskild provtagning och bevarande av huden där appliceringen har skett. I inhalationsstudier bör förteckningen över bevarade och undersökta vävnader från luftvägarna följa rekommendationerna i kapitlen B.8 och B.29 i denna bilaga. För andra organ/vävnader (och i tillägg till de specifikt bevarade vävnaderna från luftvägarna) bör de organ som finns i förteckningen som anges för den orala vägen undersökas.

▼M4

Histopatologi

38. Vägledning finns tillgänglig om bästa praxis vid genomförande av studier gällande toxikologisk patologi (33). De vävnader som minst ska undersökas är:

— Alla vävnader från högdos- och kontrollgrupperna.

— Alla vävnader från djur som dör eller avlivas under studien.

— Alla vävnader som uppvisar makroskopiska abnormaliteter, inklusive tumörer.

— När behandlingsrelaterade histopatologiska förändringar observeras i högdosgruppen, ska samma vävnader från samtliga djur i alla andra dosgrupper undersökas.

— När det gäller parvisa organ t.ex. njure, binjure, bör båda organen undersökas.

DATA OCH RAPPORTERING

Data

39. Individuella data för samtliga utvärderade parametrar bör ges. Därutöver bör alla data sammanfattas i tabellform, som för varje testgrupp visar antal djur vid testets början, antal djur som påfanns döda under testet eller som avlivats av humanitära skäl och tidpunkten för dödsfallen eller avlivningen, antal djur som visar tecken på toxicitet, en beskrivning av de tecken på toxicitet som observerats, inklusive tidpunkt för de första tecknen, varaktighet och hur allvarliga de toxiska verkningarna är, antal djur som uppvisar skador, typ av skador och procentandelen djur för varje typ av skada. Sammanfattande tabeller bör ge medelvärden och standardavvikelser (för kontinuerliga testdata) för djur som uppvisar toxiska effekter eller skador, i tillägg till skadornas gradering.

40. Historiska kontrolldata kan vara värdefulla vid tolkningen av studiens resultat, t.ex. i de fall då det finns indikationer på att de data som lämnats från de parallella kontrollerna i huvudsak avviker jämfört med aktuell data från kontrolldjuren från samma testanläggning/-koloni. Historiska kontrolldata, om de har utvärderats, bör lämnas in från samma laboratorium och relatera till djur i samma ålder och av samma stam som genererats under de fem år som föregick studien i fråga.

41. När det är tillämpligt bör numeriska resultat utvärderas genom en lämplig och allmänt vedertagen statistisk metod. Vid utformningen av studien bör de statistiska metoderna och datan som ska analyseras väljas (punkt 9). Valet bör innehålla bestämmelser om överlevnadsjusteringar, där så krävs.

Testrapport

42. Testrapporten ska omfatta följande information:

Testkemikalie:

— Fysikalisk natur, renhet och fysikalisk-kemiska egenskaper.

— Identifikationsuppgifter.

▼M4

— Kemikaliens källa.

— Satsnummer.

— Intyg om kemisk analys.

Vehikel (i förekommande fall):

— Motivering för val av vehikel (om annan än vatten).

Försöksdjur:

— Art/stam som används och motivering av valet.

— Djurens antal, ålder och kön vid testets början.

— Ursprung, inhysning, kost etc.

— Djurens individuella vikt vid testets början.

Försöksbetingelser:

— Grund för administreringssätt och dosval.

— I förekommande fall, de statistiska metoderna som använts för att analysera datan.

— Uppgifter om testkemikaliens sammansättning/foderberedning.

— Analysdata om beredningens uppnådda koncentration, stabilitet och homogenitet.

— Administreringssätt och uppgifter om testkemikaliens administrering.

— Om enbart nos eller helkropp vid inhalationsstudier.

— Faktiska doser (mg/kg kroppsvikt/dag) och omräkningsfaktor för kostens/dricksvattnets testkemikaliekoncentration (mg/kg eller ppm) till den faktiska dosen, om tillämpligt.

— Uppgifter om foder- och vattenkvalitet.

Resultat (sammanfattande data i tabellform och enskilda djurdata ska presenteras)

Allmänt

— Överlevnadsdata.

— Kroppsvikt/kroppsviktsförändringar.

— Foderförbrukning, beräkningar av fodereffektivitet, om det har utförts, och vattenförbrukning, om tillämpligt.

— Toxikokinetiska data (om tillgängligt).

— Oftalmoskopi (om tillgängligt).

— Hematologi (om tillgängligt).

— Klinisk kemi (om tillgängligt).

▼M4

Kliniska fynd

— Tecken på toxicitet.

— Förekomst (och allvarlighetsgrad) av eventuell abnormitet.

— Art, allvarlighetsgrad och varaktighet för kliniska observationer (huruvida de är övergående eller permanenta).

Obduktionsdata

— Terminal kroppsvikt.

— Organvikter och deras förhållanden, om tillämpligt.

— Obduktionsfynd, abnormaliteternas förekomst och allvarlighetsgrad.

Histopatologi

— Icke-neoplastiska histopatologiska fynd.

— Neoplastiska histopatologiska fynd.

— Sambandet mellan grova och mikroskopiska fynd.

— Detaljerad beskrivning av alla behandlingsrelaterade histopatologiska fynd, inklusive allvarlighetsgradering.

— Rapport om eventuell inbördes granskning av bilder.

Statistisk bearbetning av resultaten, när så är lämpligt

Diskussion av resultaten, inklusive:

— Diskussion om eventuella modellstrategier.

— Dos-responsförhållanden.

— Historiska kontrolldata.

— Beaktande av eventuell information om verkningssätt.

— BMD-, NOAEL- eller LOAEL-bestämning.

— Relevans för människor.

Slutsatser

LITTERATUR

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

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

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

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

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

▼M4

(6) Kapitel B.27 i denna bilaga, test avseende subkronisk oral toxicitet (90-dagars upprepat oraltest på icke-gnagare).

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

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

(9) Kapitel B.8 i denna bilaga, subakut inhalationstoxicitet: 28 dagars studie.

(10) Kapitel B.29 i denna bilaga, subkronisk inhalationstoxicitet: 90-dagars studie.

(11) Kapitel B.9 i denna bilaga, toxicitet vid upprepad dosering (28 dagar, dermalt).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

▼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 and Lumley CE (1994). The utility of the second rodent species in the carcinogenicity testing of pharmaceuticals. The Toxicologist 14(1):214.

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

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

(27) Europaparlamentets och rådets direktiv 2010/63/EU av den 22 september 2010 om skydd av djur som används för vetenskapliga ändamål, EUT L 276, 20.10.2010, s. 33–79.

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

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

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

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

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

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

▼**M4**

Tillägg 1

DEFINITION

Testkemikalie: Alla ämnen eller blandningar som testas med denna testmetod.

▼M4

B. 33 KOMBINERAD KRONISK TOXICITETS-/KARCINOGENICITETSSTUDIE

INLEDNING

1. Den här testmetoden motsvarar OECD:s testriktlinje (TG) 453 (2009). Den ursprungliga TG 453 antogs 1981. Utvecklingen av denna uppdaterade testmetod B.33 ansågs nödvändig för att återspegla den senaste utvecklingen inom djurskydd och myndighetskrav (1) (2) (3) (4) (5). Uppdateringen av denna testmetod B.33 har genomförts parallellt med revideringen av kapitel B.32 i denna bilaga, karcinogenicitetsstudier, och kapitel B.30 i denna bilaga, kroniska toxicitetsstudier, i syfte att erhålla ytterligare information om djuren som används i studien och ge ytterligare detaljer om val av dos. Den här testmetoden är avsedd att användas vid testning av ett brett spektrum av kemikalier, inklusive bekämpningsmedel och industrikemikalier. Det bör påpekas att vissa detaljer och krav kan variera för läkemedel (se internationella konferensen om harmonisering (ICH) vägledning S1B om testning av cancerframkallande läkemedel).

2. Majoriteten av kroniska toxicitetsstudier och karcinogenicitetsstudier genomförs med gnagare, och den här testmetoden är främst avsedd för studier som genomförs med dessa arter. Skulle sådana studier krävas för icke-gnagare gäller också de principer och förfaranden som beskrivs i denna testmetod, med lämpliga modifieringar, tillsammans med dem i kapitel B.27 i denna bilaga, 90-dagars oral toxicitetsstudie på icke-gnagare (6), som beskrivs i OECD:s vägledningsdokument nr 116 om utformning och genomförande av studier om kronisk toxicitet och karcinogenicitet (7).

3. De tre huvudsakliga administrationssätten som används i kroniska toxicitets-/karcinogenicitetsstudier är oral, dermal och inhalation. Valet av administreringssätt beror på de fysikaliska och kemiska egenskaperna hos testkemikalien och det dominerande exponeringssättet för människor. Ytterligare information om val av exponeringssätt ges i vägledningsdokument nr 116 (7).

4. Den här testmetoden fokuserar på exponering via oralt intag, det intag som används mest i kroniska toxicitets- och karcinogenicitetsstudier. Även om långsiktiga studier som medför exponering via huden eller inhalation kan vara nödvändiga för riskbedömning av människors hälsa och/eller kan krävas under vissa regelverk, så innebär båda exponeringsvägarna en betydande teknisk komplexitet. Sådana studier måste utformas från fall till fall, även om testmetoden som beskrivs här för bedömningen och utvärderingen av kronisk toxicitet och karcinogenicitet skulle kunna utgöra grunden för ett protokoll för inhalations- och/eller hudstudier, med hänsyn tagen till rekommendationer om behandlingsperioder, kliniska eller patologiska parametrar etc. OECD:s vägledning finns tillgänglig om administrering av testkemikalier via inhalation (7) (8) och genom huden (7). Kapitel B.8 i denna bilaga (9) och kapitel B.29 i denna bilaga (10), tillsammans med OECD:s vägledningsdokument om akut inhalationstestning (8), bör särskilt rådfrågas vid utformningen av långsiktiga studier som inbegriper exponering via inhalation. Kapitel B.9 i denna bilaga (11) bör rådfrågas när det gäller testning som utförs via huden.

▼M4

5. Den kombinerade kronisk toxicitet/karcinogenicitetsstudien ger information om möjliga hälsofaror som sannolikt kan uppstå vid upprepad exponering under en period som varar upp till hela livslängden för de arter som används. Studien ger information om de toxiska effekterna hos testkemikalien, inklusive potentiell karcinogenicitet, indikation om målorgan och möjlig ackumulering. Den kan ge en uppskattning av den icke-observerade nivån för skadliga biverkningar och, i fallet med icke-genotoxiska karcinogener, för tumörresponser som kan användas för att fastställa säkerhetskriterier för exponering av människor. Behovet av noggranna kliniska observationer av djuren i syfte att få fram så mycket information som möjligt betonas också.

6. Målen för kroniska toxicitets-/karcinogenicitetsstudier som omfattas av denna testmetod inkluderar:

— Identifieringen av de cancerframkallande egenskaperna hos en testkemikalie, vilka leder till en ökad incidens av tumörer, ökad andel maligna tumörer eller en minskning av tiden till uppkomst av tumörer, jämfört med parallella kontrollgrupper.

— Fastställandet av tiden till uppkomst av tumörer.

— Identifieringen av den kroniska toxiciteten hos testkemikalien.

— Identifieringen av målorgan(en) för kronisk toxicitet/karcinogenicitet.

— Karakterisering av förhållandet dos:respons.

— Identifieringen av nivån där ingen skadlig effekt observeras (NOAEL) eller utgångspunkten för upprättandet av en referensdos (BMD).

— Framtida konsekvenser av karcinogena effekter vid mänsklig exponering av lågdosnivåer.

— Förutsägelse av kroniska toxiska effekter på nivåer för mänsklig exponering.

— Tillhandahållande av data för att testa hypoteser om verkningssätt (2) (7) (12) (13) (14) (15).

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN

7. Vid bedömningen och utvärderingen av den potentiella karcinogeniciteten och den kroniska toxiciteten hos en testkemikalie bör all tillgänglig information om testkemikalien beaktas av testlaboratoriet innan studien genomförs, i syfte att fokusera på utformningen av studien för att mer effektivt testa dess toxikologiska egenskaper och minimera användningen av djur. Information om, och hänsyn till, verkningsmekanismen hos ett cancerframkallande ämne (2) (7) (12) (13) (14) (15) är särskilt viktig, eftersom den optimala utformningen kan variera beroende på om testkemikalien är en känd eller misstänkt genotoxisk karcinogen. Ytterligare vägledning om beaktande av verkningssätt finns i vägledningsdokument nr 116 (7).

8. Information som underlättar studiens utformning inkluderar identitet, kemisk struktur, och fysikalisk-kemiska egenskaper hos testkemikalien, eventuell information om verkningssätt, resultat från eventuella in vitro- eller in vivo-genotoxicitetstester; förväntad(e) användning(ar) och risken för mänsklig exponering, tillgängliga (Q)SAR-data, mutagenicitet/genotoxicitet, karcinogenicitet och toxikologiska data om strukturellt närbesläktade kemikalier, tillgängliga toxikokinetiska data (engångsdos- och upprepad dos-kinetik om det finns tillgängligt) och data från andra studier med upprepad exponering.

▼M4

Fastställandet av kronisk toxicitet/karcinogenicitet bör endast utföras efter att inledande information om toxicitet har erhållits från 28-dagars och/eller 90-dagars tester med upprepad dosering. Kortsiktiga initieringsfrämjande cancertester kan också ge användbar information. Ett stegvist förhållningssätt till testning av karcinogenicitet bör betraktas som en del av den övergripande bedömningen av de potentiella hälsoeffekterna för en viss testkemikalie (16) (17) (18) (19).

9. De statistiska metoder som är mest lämpade för analys av resultaten, med tanke på försöksutformningen och målen, bör fastställas innan studien påbörjas. Frågor att överväga inkluderar huruvida statistiken bör innefatta justering av överlevnad, analys av kumulativa tumörrisker i förhållande till överlevnadsvaraktighet, analys av tiden till tumören och analys i händelse av förtida terminering av en eller fler grupper. Vägledning om lämpliga statistiska analyser och viktiga referenser till internationellt erkända statistiska metoder ges i vägledningsdokument nr 116 (7), samt i vägledningsdokument nr 35 om analys och utvärdering av studier över kronisk toxicitet och karcinogenicitet (20).

10. Vid genomförandet av en studie om karcinogenicitet bör man alltid följa de vägledande principer och överväganden som beskrivs i OECD:s vägledningsdokument om erkännande, bedömning och användning av kliniska tecken som humana endpoints för försöksdjur som används i säkerhetsbedömningen (21). Se särskilt punkt 62. Detta avsnitt anger att ”I studier med upprepad dosering när ett djur visar kliniska tecken som är progressiva, vilket leder till ytterligare försämring av tillståndet, bör ett välgrundat beslut tas om man ska eller inte ska avliva djuret av humanitära skäl. Beslutet bör även omfatta övervägandet av värdet av informationen som fås genom fortsatt skötsel av det djuret i studien i förhållande till dess övergripande tillstånd. Om ett beslut har tagits att låta djuret kvarstå i testet, bör observationsfrekvensen ökas vid behov. Det är också möjligt, utan att allvarligt påverka syftet med testet, att tillfälligt upphöra med doseringen om det kan minska smärtan eller lidandet, eller att minska testdosen.”

11. Detaljerad vägledning om och diskussion om principerna för valet av dos för studier om kronisk toxicitet och karcinogenicitet finns i vägledningsdokument nr 116 (7) samt i två internationella publikationer från Life Sciences Institute (22) (23). Den centrala strategin för valet av dos är beroende av det primära målet eller målen med studien (punkt 6). Vid val av lämpliga dosnivåer bör en balans uppnås mellan faroundersökning å ena sidan och karakterisering av lågdosresponser och deras betydelse å andra sidan. Detta är särskilt relevant när det gäller denna kombinerade kroniska toxicitets- och karcinogenicitetsstudie.

12. Man bör överväga att genomföra denna kombinerade studie av kronisk toxicitet och karcinogenicitet, snarare än ett separat utförande av en studie av kronisk toxicitet (kapitel B.30 i denna bilaga) och en studie av karcinogenicitet (kapitel B.32 i denna bilaga). Det kombinerade testet ger större effektivitet vad gäller tid och kostnad, och en viss minskning av djuranvändning jämfört med att jämföra två separata studier, utan att man kompromissar med datakvaliteten i antingen den kroniska eller karcinogena fasen. Noggrant övervägande bör dock ges av principerna för valet av dos (punkterna 11 och 22–26) vid en kombinerad studie av kronisk toxicitet och karcinogenicitet, och det är också erkänt att separata studier kan krävas under vissa regelverk. Ytterligare vägledning om utformningen av den kombinerade kroniska toxicitets- och karcinogenicitetsstudien för att uppnå maximal studieprestanda när det gäller möjligheterna att minska antalet djur som används, så väl som rationalisering av de olika försöksförfaranden finns i vägledningsdokument nr 116 (7).

▼M4

13. Definitioner som används inom ramen för den här metoden finns i slutet av det här kapitlet och i vägledningsdokument nr 116 (7).

PRINCIP FÖR TESTMETODEN

14. Studien är utformad med två parallella faser, en kronisk fas och karcinogenicitetsfas (se respektive punkt 34 och 35 för varaktighet). Testkemikalien administreras normalt oralt även om inhalation eller via huden också kan vara lämpligt. För den kroniska fasen administreras testkemikalien dagligen i graderade doser till flera grupper försöksdjur, en dosnivå per grupp, i allmänhet under en 12-månadersperiod, även om kortare eller längre varaktigheter kan väljas beroende på myndighetskrav (se punkt 34). Denna längd är vald för att vara tillräckligt lång för att eventuella effekter av kumulativ toxicitet blir uppenbara, utan de störande effekterna av geriatriska förändringar. Studiens utformning kan även omfatta en eller flera avlivningar t.ex. vid 3 eller 6 månader, och ytterligare djur kan inkluderas för att tillgodose detta (se punkt 20). För karcinogenicitetsfasen administreras testkemikalien dagligen till flera grupper av försöksdjur under en större del av deras livslängd. Djuren observeras noggrant i båda faserna avseende tecken på toxicitet och utvecklingen av neoplastiska skador. Djur som dör eller avlivas under testet obduceras, och i slutet av testet avlivas överlevande djur och obduceras.

METODBESKRIVNING

Val av djurart

15. Den här testmetoden täcker främst bedömning och utvärdering av kronisk toxicitet och karcinogenicitet hos gnagare (punkt 2). Användningen av icke-gnagare kan övervägas när tillgängliga data tyder på att de är mer relevanta för förutsägelser av hälsoeffekter på människor. Valet av art bör motiveras. Rekommenderad gnagare är råtta, även om andra gnagare t.ex. mus kan användas. Även om användningen av möss i karcinogenicitetstester kan ha begränsad användbarhet (24) (25) (26), krävs fortfarande karcinogenicitetstester med möss under några aktuella regelverk såvida det inte kan fastställas att en sådan studie inte är vetenskapligt nödvändig. Råttor och möss har föredragits på grund av deras relativt korta livslängd, deras breda användning i farmakologiska och toxikologiska studier, deras känslighet för tumörinduktion och tillgången på stammar som beskrivits tillräckligt ingående. Som en följd av dessa egenskaper finns en stor mängd information tillgänglig om deras fysiologi och patologi. Utformning och genomförande av kroniska toxicitets-/karcinogenicitetsstudier i icke-gnagare, när så krävs, bör baseras på de principer som beskrivs i denna testmetod tillsammans med dem i kapitel B.27 i denna bilaga, 90-dagars oral toxicitetsstudie på icke-gnagare med upprepad dosering (6). Ytterligare information om val av arter och stam ges i OECD:s vägledningsdokument nr 116 (7).

16. I testet bör unga friska vuxna djur användas av stammar som vanligtvis används på laboratorier. Den kombinerade kroniska toxicitets-/karcinogenicitetsstudien bör utföras på djur från samma stam och ursprung som de som användes i den inledande toxicitetsstudien(erna) med kortare varaktighet, dock, om djur från samma stam och ursprung är kända för att ge problem med att uppnå det normalt accepterade kriteriet för överlevnad i långsiktiga studier (se vägledningsdokument nr 116 (7)), bör man bör överväga att använda en stam med acceptabel överlevnadsgrad för den långsiktiga studien. Honorna ska inte ha fått ungar och inte vara dräktiga.

▼M4

Inhysnings- och utfodringsförhållanden

17. Djuren kan inhysas individuellt, eller i små grupper av samma kön; individuell inhysning ska endast övervägas om det är vetenskapligt motiverat (27) (28) (29). Burarna bör placeras så att en möjlig påverkan beroende på deras placering minimeras. Temperaturen i försöksdjurens utrymmen bör vara 22 °C (± 3 °C). Den relativa fuktigheten bör vara minst 30 % och helst inte överstiga 70 % utom när rummet rengörs, och målet bör vara 50–60 %. Belysningen bör vara artificiell, med omväxlande 12 timmar ljus och 12 timmar mörker. För utfodringen kan konventionellt laboratoriefoder användas med ett obegränsat utbud av dricksvatten. Kosten ska uppfylla alla näringsmässiga krav för arterna som testas och innehållet av föroreningar i kosten som kan påverka testresultatet inkluderar, men är ej begränsade till, bekämpningsmedelsrester, långlivade organiska föroreningar, fytoöstrogener, tungmetaller och mykotoxiner, och bör vara så låga som möjligt. Analytisk information om närings- och kostföroreningsnivåer bör genereras periodiskt, åtminstone i början av studien och när det finns en förändring i det använda partiet, och bör ingå i den slutliga rapporten. Analytisk information om dricksvattnet som används i studien ska likaledes ingå. Valet av foder kan påverkas av behovet av att säkerställa en lämplig blandning av en testkemikalie och för att tillgodose djurens näringsbehov när testkemikalien tillförs genom kosten.

Förberedelse av djuren

18. Friska djur, som har acklimatiserat sig till laboratoriets betingelser i minst 7 dagar och inte tidigare har ingått i försök, ska användas. När det gäller gnagare bör doseringen av djuren påbörjas snarast möjligt efter avvänjning och acklimatisering, och helst innan djuren är 8 veckor gamla. Försöksdjuren bör karakteriseras efter art, stam, ursprung, kön, vikt och ålder. Vid undersökningens början bör viktvariationen hos varje kön vara minimal och inte överstiga ± 20 % av medelvikten för alla djur inom studien, separat för varje kön. Djuren fördelas slumpvis i kontroll- och behandlingsgrupperna. Efter randomiseringen bör det inte finnas några signifikanta skillnader i genomsnittliga kroppsvikter mellan grupper inom varje kön. Om det finns statistiskt signifikanta skillnader, bör randomiseringssteget upprepas, om möjligt. Varje djur bör tilldelas ett unikt identifikationsnummer, och märkas permanent med detta nummer genom tatuering, mikrochipimplantat, eller med annan lämplig metod.

PROCEDUR

Djurens antal och kön

19. Bägge könen ska användas. Ett tillräckligt antal djur ska användas så att en grundlig biologisk och statistisk utvärdering är möjlig. För gnagare ska varje dosgrupp (som beskrivs i punkt 22) och parallell kontrollgrupp för studiens karcinogenicitetsfas innehålla minst 50 djur av varje kön. Beroende på syftet med studien finns det möjlighet att öka den statistiska giltigheten för de viktigaste uppskattningarna genom att fördela djuren ojämnt till de olika dosgrupperna, med t.ex. fler än 50 djur i lågdosgruppen, för att uppskatta den cancerframkallande potentialen i låga doser. Det ska dock erkännas att en måttlig ökning av gruppstorlek ger en relativt liten ökning av den statistiska giltigheten för studien. Varje dosgrupp (som beskrivs i punkt 22) och parallell kontrollgrupp för studiens kroniska toxicitetsfas bör innehålla minst 10 djur av varje kön när det gäller gnagare. Det bör noteras att denna

▼M4

siffra är lägre än i studien för kronisk toxicitet (kapitel B.30 i denna bilaga). Tolkningen av data från det minskade antalet djur per grupp i den kroniska toxicitetsfasen i denna kombinerade studie kommer dock att stödjas av data från det större antalet djur i studiens karcinogenicitetsfas. I studier där möss ingår behövs fler djur i varje dosgrupp för den kroniska toxicitetsfasen för att genomföra alla nödvändiga hematologiska bestämningar. Ytterligare information om statistisk utformning av studien och val av dosnivåer för att maximera den statistiska giltigheten finns i vägledningsdokument nr 116 (7).

Avsättningar för avlivningar, satellitgrupp och kontrolldjur.

20. Studien får föreskriva avlivningar efter t.ex. 6 månader för den kroniska toxicitetsfasen för att få information om framskridandet av icke-neoplastiska förändringar och mekanistisk information, om det är vetenskapligt motiverat. Om sådan information om testkemikalien redan finns tillgänglig från tidigare toxicitetsstudier med upprepad dosering kanske inte avlivningar är vetenskapligt motiverade. De djur som används i den kroniska toxicitetsfasen, normalt 12 månaders varaktighet (punkt 34) ger avlivningsdata för den karcinogena fasen i studien, på så sätt uppnås ett totalt minskat antal djur. Satellitgrupper kan också ingå i den kroniska toxicitetsfasen av studien, för att övervaka reversibiliteten av eventuella toxikologiska förändringar som orsakats av den testkemikalie som undersöks. Dessa kan begränsas till studiens högsta dosnivå plus kontroll. Ytterligare en grupp kontrolldjur (normalt 5 djur per kön) kan ingå för övervakning av sjukdomsstatus under studien (30), om nödvändigt. Ytterligare vägledning om studiens utformning för att omfatta avlivningar, satellit- och kontrolldjur, samtidigt som antalet djur som används totalt minskas ges i vägledningsdokument nr 116 (7).

21. Om satellitdjur och/eller avlivningar inkluderas i studien, kommer antalet djur i varje dosgrupp som inkluderas i detta syfte normalt vara 10 djur per kön, och det totala antalet djur som ingår i studiens utformning ska ökas med det antal djur som planeras att avlivas innan studien slutförs. Avlivningar och satellitdjur bör normalt genomgå samma observationer, inklusive kroppsvikt, foder-/vattenkonsumtion, hematologiska och kliniska biokemiska mätningar och patologiska undersökningar som djuren i den kroniska toxicitetsfasen i huvudstudien, även om avsättningar också kan göras (i avlivningsgruppen) för att mätningar ska begränsas till vissa viktiga mätningar såsom neurotoxicitet eller immunotoxicitet.

Dosgrupper och dosering

22. Vägledning över alla aspekter av valet av dos och dosnivå finns i vägledningsdokument nr 116 (7). Minst tre dosnivåer och en parallell kontrollgrupp ska användas, för både den kroniska fasen och karcinogenicitetsfasen. Dosnivåer grundas i allmänhet på resultaten från en korttidsstudie med upprepad dosering eller en spännviddsstudie och bör beakta eventuella toxikokinetiska data som finns tillgängliga om testkemikalien eller närbesläktade kemikalier.

▼M4

23. För den kroniska toxicitetsfasen, kan en fullständig studie med tre dosnivåer inte anses vara nödvändig om det är troligt att en studie med en dosnivå på motsvarande minst 1 000 mg/kg kroppsvikt/dag inte ger några skadliga effekter. Detta bör baseras på information från inledande studier och med hänsyn till att toxicitet inte förväntas baserat på data från strukturellt närbesläktade kemikalier. En gräns på 1 000 mg/kg kroppsvikt/dag kan tillämpas, utom när mänsklig exponering anger att en högre dosnivå ska användas.

24. Såvida den inte är begränsad genom testkemikaliens fysikalisk-kemiska natur eller biologiska verkningar, bör den högsta dosnivån väljas för att identifiera de viktigaste målorganen och de toxiska effekterna, samtidigt som man undviker lidande, svår toxicitet, sjuklighet eller död. Den högsta dosnivån ska normalt väljas för att framkalla tecken på toxicitet, vilket t.ex. framgår av en minskning av kroppens viktökning (ca 10 %). Dock kan beroende på målen för studien (se punkt 6), en övre dos lägre än den dos som ger tecken på toxicitet väljas, t.ex. om en dos framkallar en negativ effekt som har försumbar eller ingen påverkan på livslängd eller kroppsvikt.

25. Dosnivåer och dosnivåspridning kan väljas för att etablera en dosrespons och, beroende av testkemikaliens verkningssätt, en NOAEL eller andra avsedda resultat från studien t.ex. en BMD (se punkt 27). Faktorer som bör beaktas i placeringen av lägre doser inkluderar den förväntade lutningen för dosrespons-kurvan, de doser vid vilka viktiga förändringar kan uppstå i metabolismen eller den toxiska verkningens art, där ett tröskelvärde förväntas eller där en utgångspunkt för lågdosextrapolering förväntas. Vid genomförandet av en kombinerad karcinogenicitets-/kronisk toxicitetsstudie, är det primära målet att erhålla information för riskbedömning beträffande karcinogenicitet, och information om kronisk toxicitet är normalt ett delmål. Detta bör beaktas vid val av dosnivåer och dosnivåspridning för studien.

26. Den dosnivåspridning som väljs beror på målen med studien och testkemikaliens egenskaper, och kan inte föreskrivas i detalj i denna testmetod, men två- till fyrfaldiga dosintervall ger ofta bra testprestanda för att fastställa fallande dosnivåer, och tillägg av en fjärde testgrupp är att föredra framför användningen av mycket stora intervall (t.ex. mer än en faktor på ca 6–10) mellan doseringarna. I allmänhet bör användningen av faktorer som är större än 10 undvikas och motiveras om de används.

27. Såsom vidare beskrivits i vägledningsdokument nr 116 (7), inkluderar punkter som ska beaktas vid valet av dos:

— Kända eller misstänkta olinjäriteter eller inflexionspunkter i dosresponsen.

— Toxikokinetik och dosintervall där metabolisk induktion, mättnad eller olinjäritet mellan externa och interna doser uppträder eller ej.

— Utgångsskador, markörer för verkan eller indikatorer för viktiga underliggande biologiska processer.

▼M4

— Nyckelaspekter (eller misstänkta sådana) för verkningsmekanismer, såsom doser vid vilka cytotoxicitet börjar uppstå, hormonnivåerna störs, homeostatiska mekanismer är överväldigande etc.

— Områden i dosrespons-kurvan där en särskilt stabil uppskattning behövs, t.ex. intervallet för förväntad BMD eller ett misstänkt tröskelvärde.

— Beaktande av förväntade exponeringsnivåer för människor, särskilt vid valet av mellan- och lågdoser.

28. Kontrollgruppen ska vara en obehandlad grupp eller en vehikelkontrollgrupp, om en vehikel används för tillförsel av testkemikalien. Med undantag av behandlingen med testkemikalien, bör djuren i kontrollgruppen hanteras på exakt samma sätt som de i testgrupperna. Om en vehikel används ska kontrollgruppen tillföras vehikeln i den största volym som används bland dosgrupperna. Om en testkemikalie tillförs via kosten och förorsakar ett betydligt minskat intag på grund av mindre välsmakande kost, kan ytterligare en parutfodrad kontrollgrupp vara användbar för en lämpligare kontroll.

Beredning av doser och administrering av testkemikalie

29. Testkemikalien tillförs vanligtvis oralt, via kosten eller dricksvattnet, eller genom sondmatning. Ytterligare information om vägar och metoder för administrering ges i OECD:s vägledningsdokument nr 116 (7). Vägen och metoden för administrering beror på syftet med studien, de fysikalisk/kemiska egenskaperna hos testkemikalien, dess biotillgänglighet, och dominerande väg och metod för exponering av människor. En motivering bör ges för vald väg och metod för administrering. Med tanke på djurskydd bör oral sondmatning normalt väljas endast för de ämnen för vilka denna väg och metod för administrering representerar en potentiell mänsklig exponering (t.ex. läkemedel). För kost- eller miljökemikalier inklusive bekämpningsmedel, sker administrering vanligtvis via foder eller dricksvatten. För några situationer, t.ex. arbetsrelaterad exponering, kan administrering via andra vägar vara lämpligare.

30. Vid behov kan testkemikalien upplösas eller suspenderas i en lämplig vehikel. Hänsyn bör tas till följande egenskaper hos vehikeln och andra tillsatsämnen, i förekommande fall: verkningar på absorption, distribution, metabolism eller retention av testkemikalien, verkningar på testkemikaliens kemiska egenskaper som kan förändra dess toxiska egenskaper samt påverkan på foder- eller vattenkonsumtion, eller djurens nutritionsstatus. Det rekommenderas, när så är möjligt, att man först använder en vattenbaserad lösning/suspension följt av en lösning/emulsion i olja (t.ex. majsolja) och därefter eventuell lösning i andra vehiklar. För andra vehiklar än vatten bör de toxiska egenskaperna hos vehikeln vara kända. Information om testkemikaliens stabilitet och doseringslösningarnas eller fodrets homogenitet (i förekommande fall) enligt villkoren för administreringen (t.ex. kost), bör finnas tillgänglig.

31. För kemikalier som tillförs via foder eller dricksvatten är det viktigt att säkerställa att kvantiteterna av den berörda testkemikalien inte påverkar normal närings- eller vattenbalans. I långtidsstudier med kostadministrering bör koncentrationen av testkemikalien i fodret normalt inte överskrida en övre gräns på 5 % av den totala kosten, för att undvika näringsmässig obalans. När testkemikalien tillförs via kosten kan antingen en konstant foderkoncentration (mg/kg foder eller ppm) eller en konstant dosnivå i förhållande till djurens kroppsvikt (mg/kg kroppsvikt), beräknad på veckobasis, användas. Det alternativ som används ska anges.

▼M4

32. När det gäller oral administrering doseras djuren dagligen med testkemikalien (sju dagar i veckan) under en period på 12 månader (kronisk fas) eller 24 månader (karcinogenicitetsfas), se också punkterna 33 och 34. Alla andra doseringsscheman t.ex. fem dagar per vecka måste motiveras. När det gäller dermal administrering, behandlas djuren normalt med testkemikalien minst 6 timmar per dag, 7 dagar per vecka, enligt kapitel B.9 i denna bilaga (11), under en period av 12 månader (kronisk fas) eller 24 månader (karcinogenicitetsfas). Exponering genom inhalation utförs 6 timmar per dag, 7 dagar per vecka, men exponering 5 dagar per vecka kan också användas om detta är motiverat. Exponeringsperioden är normalt 12 månader (kronisk fas) eller 24 månader (karcinogenicitetsfas). Om andra gnagare än råttor utsätts för enbart nos, kan de maximala exponeringstiderna justeras för att minska artspecifikt lidande. En motivering bör ges när man använder en exponeringstid kortare än 6 timmar per dag. Se också kapitel B.8 i denna bilaga (9).

33. När en testkemikalie administreras via sondmatning bör detta ske via en magsond eller en lämplig intubationskanyl vid ungefär samma tid varje dag. Normalt administreras en singeldos en gång per dag, men om en kemikalie är lokalt irriterande är det möjligt att upprätthålla den dagliga dosen genom delad dos (två gånger per dag). Den största mängd vätska som kan administreras vid ett tillfälle beror på försöksdjurets storlek. Volymen bör vara så liten som möjligt, och bör normalt inte överstiga 1 ml/100 g kroppsvikt för gnagare (31). Variationer i testvolym bör minimeras genom justering av koncentrationen för att säkerställa en konstant volym vid alla dosnivåer. Potentiellt frätande eller irriterande kemikalier är undantagna, och måste spädas ut för att allvarliga lokala verkningar ska kunna undvikas. Testning vid koncentrationer som sannolikt är frätande eller irriterande för magtarmkanalen bör undvikas.

Studiens varaktighet

34. Doseringsperioden och varaktigheten för den kroniska fasen i den här studien är i allmänhet 12 månader, även om studiens utformning medger och kan tillämpas på antingen kortare (t.ex. 6 eller 9 månader) eller längre (t.ex. 18 eller 24 månader) varaktighetsstudier, beroende på kraven från särskilda regelverk eller särskilda mekanistiska ändamål. Avvikelser från en exponeringstid på 12 månader bör motiveras, särskilt när det gäller kortare varaktigheter. Alla dosgrupper som tilldelats denna fas kommer att avslutas vid den utsatta tidpunkten för utvärdering av kronisk toxicitet och icke-neoplastisk patologi. Satellitgrupper som ingår för att övervaka reversibiliteten av eventuella toxikologiska förändringar som orsakats av den testkemikalie som undersöks, ska bibehållas utan dosering under en period som inte är kortare än 4 veckor och inte längre än en tredjedel av den totala studieperioden efter avslutad exponering.

35. Studiens varaktighet för den karcinogenicitetiska fasen av studien är normalt 24 månader för gnagare, vilket motsvarar huvuddelen av livslängden för de djur som används. Kortare eller längre varaktigheter kan användas, beroende på livslängden för djurarten i studien, men bör motiveras. För specifika stammar av möss t.ex. AKR/J-, C3H/J- eller C57BL/6J-stammar kan en varaktighet på 18 månader vara mer lämplig. Det följande ger viss vägledning om varaktighet, studiens upphörande och överlevnad, ytterligare vägledning, inbegripet en bedömning av huruvida en negativ karcinogenicitetsstudie i förhållande till överlevnad är godtagbar, finns i vägledningsdokument nr 116 (7).

▼M4

— Studiens upphörande bör beaktas när antalet överlevare i de lägre dosgrupperna understiger 25 procent.

— I de fall där endast högdosgruppen dör i förtid på grund av toxicitet bör detta inte leda till upphörande av studien.

— Överlevnad för vardera kön ska beaktas för sig.

— Studien bör inte fortsätta över den punkt där tillgängliga data från studien inte längre är tillräckliga för att ge en statistisk giltig utvärdering.

OBSERVATIONER (KRONISK TOXICITETSFAS)

36. Samtliga djur bör observeras beträffande sjuklighet eller mortalitet, vanligtvis i början och slutet av varje dag, inklusive helger och helgdagar. Allmänna kliniska observationer bör göras minst en gång per dag, helst vid samma tidpunkt(er), och ta hänsyn till maximalt förväntade effekter efter doseringen när det gäller administrering via sondmatning.

37. Detaljerade kliniska observationer bör göras på samtliga djur minst en gång före den första exponeringen (för jämförelser inom samma objekt), i slutet av studiens första vecka och därefter varje månad. Observationsprotokollet bör anordnas så att variationerna mellan enskilda observatörer minimeras och är oberoende av testgrupp. Dessa observationer bör göras utanför buren på avsedd plats, ungefär vid samma tidpunkter varje gång. De bör noggrant registreras, helst med hjälp av ett poängsystem som utförligt definierats av testlaboratoriet. Ansträngningar bör göras för att säkerställa att variationer i observationsbetingelserna är minimala. Observationerna bör omfatta, men inte begränsas till, förändringar av hud, päls, ögon, slemhinnor, förekomst av sekret och utsöndringar samt autonom aktivitet (t.ex. tårflöde, upprest hårrem, pupillstorlek, ovanligt andningsmönster). Förändringar i gång, hållning och reaktion på hantering liksom eventuella kramper eller spasmer, stereotypier (t.ex. överdrivet putsande, repetitivt cirklande) eller bisarrt beteende (t.ex. självstympning, baklängesgång) bör också registreras (32).

38. En oftalmologisk undersökning med ett oftalmoskop eller annan lämplig utrustning bör utföras på samtliga djur före den första administreringen av testkemikalien. Vid slutet av studien bör denna undersökning helst utföras på samtliga djur, men åtminstone på högdos- och kontrollgrupperna. Om behandlingsrelaterade ögonförändringar upptäcks bör samtliga djur undersökas. Om strukturell analys eller annan information tyder på okulär toxicitet bör frekvensen på okulära undersökningar höjas.

39. För kemikalier där tidigare 28-dagars och/eller 90-dagars toxicitetstest med upprepad dosering indikerade en potential för att framkalla neurotoxiska effekter, bör sensorisk reaktion på stimuli av olika slag (32) (t.ex. hörsel, syn och djupsensorisk stimuli) (33), (34), (35), bedömning av greppstyrka (36) och bedömning av motorisk aktivitet (37) eventuellt utföras före studiestarten och i 3-månadersperioder efter studiestarten till och med 12 månader, samt vid studiens upphörande (om längre än 12 månader). Ytterligare uppgifter om de procedurer som kan följas finns i respektive hänvisningar. Dock kan andra procedurer än de som hänvisats till också användas.

▼M4

40. För kemikalier där tidigare 28-dagars och/eller 90-dagars toxicitetstester med upprepad dosering indikerade en potential för att orsaka immunologiska effekter, kan ytterligare undersökningar av denna endpoint eventuellt utföras vid avslutningen.

Kroppsvikt, foder-/vattenkonsumtion och fodereffektivitet

41. Samtliga djur bör vägas vid behandlingens början, minst en gång i veckan de första 13 veckorna och därefter minst en gång per månad. Mätningar av foderkonsumtion och fodereffektivitet bör minst göras varje vecka de 13 första veckorna och därefter minst en gång per månad. Vattenkonsumtionen bör mätas minst en gång per vecka de 13 första veckorna, och därefter minst en gång per månad, när testkemikalien administreras via dricksvattnet. Mätningar av vattenkonsumtionen bör också övervägas för studier där vattendrickandet förändras.

Hematologi och klinisk biokemi

42. I studier med gnagare bör hematologiska undersökningar utföras på samtliga djur (10 handjur och 10 hondjur per grupp), vid 3, 6 och 12 månader, samt vid studiens upphörande (om längre än 12 månader). Satellitdjur kan behövas när det gäller möss för att genomföra alla nödvändiga hematologiska bestämningar (se punkt 19). För icke-gnagare måste prover tas från ett mindre antal djur (t.ex. 4 djur per kön och per grupp för hundstudier) vid mellanliggande provtagningstillfällen och avslutandet enligt vad som beskrivits för gnagare. Mätningar vid 3 månader, antingen på gnagare eller icke-gnagare, behöver inte utföras om inga effekter syntes på hematologiska parametrar i en tidigare 90-dagars studie som genomfördes med jämförbara dosnivåer. Blodprover bör tas under narkos från angivet ställe, till exempel genom hjärtpunktering eller från retro-orbitalsinus.

43. Följande lista över parametrar bör undersökas (38): Total- och differentialräkning av vita blodkroppar, erytrocytantal, trombocytantal, hemoglobinkoncentration, hematokrit (packad cellvolym), medelvärde för korpuskulärvolym (MCV), medelvärde för korpuskulärt hemoglobin (MCH), medelvärde för korpuskulär hemoglobinkoncentration (MCHC), protrombintid och aktiverad partiell tromboplastintid. Övriga hematologiska parametrar såsom Heinz-kroppar eller annan atypisk erytrocytmorfologi eller methemoglobin kan mätas på lämpligt sätt beroende på testkemikaliens toxicitet. Sammantaget bör en flexibel strategi antas, beroende på den observerade och/eller förväntade verkningen av en given testkemikalie. Om testkemikalien har en effekt på det hematopoetiska systemet, kan retikulocytantal och benmärgscytologi också anges, men detta behöver inte utföras rutinmässigt.

44. Kliniska biokemiska bestämningar för att undersöka större toxiska effekter i vävnader och, särskilt, effekter på lever och njurar bör utföras på blodprov från samtliga försöksdjur (10 handjur och 10 hondjur per grupp), vid samma tidsintervaller som specificerades för de hematologiska undersökningarna. Satellitdjur kan behövas när det gäller möss för att genomföra alla nödvändiga kliniska biokemiska bestämningar. För icke-gnagare måste prover tas från ett mindre antal djur (t.ex. 4 djur per kön och per grupp för hundstudier) vid mellanliggande provtagningstillfällen och avslutandet enligt vad som beskrivits för gnagare. Mätningar vid 3 månader, antingen på gnagare eller icke-gnagare, behöver inte utföras om inga effekter syntes på kliniska biokemiska parametrar i en tidigare 90-dagars studie som genomfördes med

▼M4

jämförbara dosnivåer. Det rekommenderas att djuren fastar över natten (med undantag av möss) före blodprovstagningen ([1]). Följande lista över parametrar bör undersökas (38): Glukos, urea (ureakväve), kreatinin, totalprotein, albumin, kalcium, natrium, kalium, totalkolesterol, minst två lämpliga tester för hepatocellular utvärdering (alaninaminotransferas, aspartataminotransferas, glutamatdehydrogenas, totala gallsyror) (39), och minst två lämpliga tester för hepatobiliär utvärdering (alkaliskt fosfatas, gammaglutamyl transferas, 5'-nukleotidas, totalt bilirubin, totala gallsyror) (39). Andra kliniska kemiska parametrar såsom triglycerider vid fasta, specifika hormoner och kolinesteras kan mätas på lämpligt sätt, beroende på testkemikaliens toxicitet. Sammantaget finns det ett behov av en flexibel strategi, beroende på den observerade och/eller förväntade verkningen av en given testkemikalie.

45. Urinanalyserna bör utföras på samtliga försöksdjur (10 handjur och 10 hondjur per grupp), på prov som tagits vid samma intervaller som för hematologi och klinisk kemi. Mätningar vid 3 månader behöver inte utföras om ingen effekt syntes på urinanalysen i en tidigare 90-dagars studie som genomfördes med jämförbara dosnivåer. Följande lista över parametrar ingick i en sakkunnig rekommendation om kliniska patologiska studier (38): Utseende, volym, osmolalitet eller specifik vikt, pH, totalprotein och glukos. Andra bestämningar inkluderar keton, urobilinogen, bilirubin och ockult blödning. Ytterligare parametrar kan användas vid behov för att utvidga undersökningen av observerad(e) verkning(ar).

46. Det anses allmänt att utgångsvärden för hematologiska och kliniska kemiska variabler behöver bestämmas före behandlingen i hundstudier, men inte behöver bestämmas för studier i gnagare (38). Om historiska basdata (se punkt 58) är otillräckliga bör man överväga att generera sådana data.

PATOLOGI

Obduktion

47. Samtliga djur i studien bör normalt underkastas en fullständig obduktion, som omfattar omsorgsfull granskning av kroppens yttre ytor, alla kroppsöppningar samt kranium, bröst- och bukhåla samt deras innehåll. En bestämmelse kan också göras (i avlivnings- eller satellitgrupperna) så att mätningarna begränsas till vissa viktiga åtgärder, såsom neurotoxicitet eller immunotoxicitet (se punkt 21). Dessa djur behöver inte obduceras och efterföljande procedurer beskrivs i nedanstående punkter. Obduktion kan från fall till fall krävas av indikatordjur, efter beslut av försöksledaren.

([1]) För ett antal mätningar i serum och plasma, särskilt glukos, är det önskvärt med fasta över natten. Den största orsaken till detta är att den ökade variationen som oundvikligen resulterar från icke-fastande, tenderar att maskera mer subtila effekter och göra tolkningen svår. Dock bör det noteras att fastande över natten kan påverka djurens allmänna metabolism, särskilt beträffande utfodringsstudier, och kan störa den dagliga exponeringen av testkemikalien. Samtliga djur bör bedömas i samma fysiologiska tillstånd och därför bör detaljerade eller neurologiska bedömningar planeras för annan dag än den kliniska biokemiska provtagningen.

▼M4

48. Organvikter bör samlas från samtliga djur, förutom de som undantas genom den senare delen av punkt 47. Binjurar, hjärna, bitestiklar, hjärta, njurar, lever, äggstockar, mjälte, testiklar, sköldkörtel (vägda efter fixering, med bisköldkörtlar) och livmoder från samtliga djur (bortsett från de döende och/eller avlivade) putsas från angränsande vävnad, i förekommande fall, och deras våtvikt bestäms så snart som möjligt efter dissektionen för att undvika uttorkning.

49. Följande vävnader bör bevaras i det mest lämpade fixeringsmedlet för både vävnadstypen och den planerade efterföljande histopatologiska undersökningen (40) (vävnader inom hakparenteser är valfria):

alla större skador	hjärta	pankreas	mage (förmagen, glandulärmagen)
binjure	ileum	bisköldkörtel	[tänder]
aorta	jejunum	perifer nerv	testikel
hjärna (inklusive delar av cerebrum, cerebellum och medulla/pons)	njure	hypofys	tymus
cekum	tårkörtel (exorbital)	prostata	sköldkörtel
cervix	lever	rektum	[tunga]
koagulerande körtel	lunga	spottkörtel	trakea
kolon	lymfkörtlar (både ytliga och djupa)	sädesblåsa	urinblåsa
tolvfingertarm	bröstkörtel (obligatorisk för honor, och om synlig och dissekeringsbar hos hanar)	skelettmuskel	uterus (inklusive cervix)
bitestikel	[övre luftvägarna, inklusive nos, turbinates och bihålorna]	hud	[ureter]
öga (inklusive näthinna)	esofagus	ryggmärg (på tre nivåer: cervikal, mitt på bröstkorgen och ländryggen)	[uretra]
[lårben med led]	[luktbulb]	mjälte	vagina
gallblåsa (för andra arter än råtta)	äggstock	[bröstben],	snitt av ryggmärgen och/eller ett färskt benmärgsaspirat
Harderiankörtel			

▼M4

När det gäller parvisa organ t.ex. njure, binjure, bör båda organen bevaras. Kliniska och andra fynd kan indikera behovet av att undersöka ytterligare vävnader. Också alla organ som sannolikt är målorgan, baserat på kunskap om testkemikaliens egenskaper, ska konserveras. I studier som inbegriper administrering via huden bör listan på organ som anges för oralt intag undersökas, och det är nödvändigt med särskild provtagning och bevarande av huden där appliceringen har skett. I inhalationsstudier bör förteckningen över bevarade och undersökta vävnader från luftvägarna följa rekommendationerna i kapitel B.8 (9) och kapitel B.29 i denna bilaga (10). För andra organ/vävnader (och i tillägg till de specifikt bevarade vävnaderna från luftvägarna) bör de organ som finns i förteckningen som anges för den orala vägen undersökas.

Histopatologi

50. Vägledning finns tillgänglig om bästa praxis vid genomförande av studier gällande toxikologisk patologi (40). Den minsta histopatologiska undersökningen bör vara:

— Alla vävnader från högdos- och kontrollgrupperna.

— Alla vävnader från djur som dör eller avlivas under studien.

— Alla vävnader som uppvisar makroskopiska abnormaliteter.

— Målvävnader, eller vävnader som uppvisade behandlingsrelaterade förändringar i högdosgruppen, från samtliga djur i alla andra doseringsgrupper,

— När det gäller parvisa organ t.ex. njure, binjure, bör båda organen undersökas.

OBSERVATIONER (KARCINOGENICITETSFAS)

51. Samtliga djur bör observeras beträffande sjuklighet eller mortalitet, vanligtvis i början och slutet av varje dag, inklusive helger och helgdagar. Djuren bör dessutom kontrolleras en gång per dag för särskilda tecken med toxikologisk relevans. När det gäller sondmatningsstudier bör djuren kontrolleras under perioden omedelbart efter dosering. Särskild uppmärksamhet bör ges åt tumörutveckling och tidpunkten för tumörens uppkomst, plats, mått, utseende, och utvecklingen av varje tydlig eller kännbar tumör ska registreras.

52. Samtliga djur bör vägas vid behandlingens början, minst en gång i veckan de första 13 veckorna och därefter minst en gång per månad. Mätningar av foderkonsumtion och fodereffektivitet bör minst göras varje vecka de 13 första veckorna och därefter minst en gång per månad. Vattenkonsumtionen bör mätas minst en gång per vecka de 13 första veckorna, och därefter minst en gång per månad, när testkemikalien administreras via dricksvattnet. Mätningar av vattenkonsumtionen bör också övervägas för studier där vattendrickandet förändras.

▼M4

Hematologiska, kliniska biokemiska och andra mätningar

53. För att maximera informationen som erhållits från studien, särskilt överväganden gällande verkningssätt, kan blodprover tas för hematologi och klinisk biokemi, även om detta avgörs av försöksledaren. Urinanalys kan även vara lämplig. Data om djuren som används i studiens kroniska toxicitetsfas, vanligtvis efter en 12-månaders varaktighet (punkt 34) ger information om dessa parametrar. Ytterligare vägledning om värdet med att ta sådana prov som en del av en karcinogenicitetsstudie finns i vägledningsdokument nr 116 (7). Om blodprov tas så bör dessa samlas i slutet av testperioden, strax före eller som ett led i avlivningsförfarandet. De bör tas under narkos från angivet ställe, till exempel genom hjärtpunktering eller från retro-orbitalsinus. Blodutstryk kan också beredas för undersökning, särskilt om benmärgen verkar vara målorganet, även om värdet av en sådan undersökning av blodutstryk i karcinogenicitetsfasen för bestämning av karcinogen/onkogen potential har ifrågasatts (38).

PATOLOGI

Obduktion

54. Samtliga djur i studien med undantag av kontrolldjur och andra satellitgrupper (se punkt 20), ska underkastas en fullständig obduktion som omfattar omsorgsfull granskning av kroppens yttre ytor, alla kroppsöppningar samt kranium, bröst- och bukhåla samt deras innehåll. Obduktion kan från fall till fall krävas av indikatordjur och andra satellitdjur efter beslut av försöksledaren. Organvikter är normalt inte en del av en karcinogen studie, eftersom geriatriska förändringar och, i senare skeden, utvecklingen av tumörer förvirrar användbarheten av organviktsdatan. De kan dock vara avgörande för att göra en sammanvägd bedömning, och särskilt för överväganden beträffande verkningssätt. Om de är en del av en satellitstudie bör de inte samlas in senare än ett år efter studiens inledning.

55. Följande vävnader bör bevaras i det mest lämpade fixeringsmedlet för både vävnadstypen och den planerade efterföljande histopatologiska undersökningen (40) (vävnader inom hakparenteser är valfria):

alla större skador	hjärta	pankreas	mage (förmagen, glandulärmagen)
binjure	ileum	bisköldkörtel	[tänder]
aorta	jejunum	perifer nerv	testikel
hjärna (inklusive delar av cerebrum, cerebellum och medulla/pons)	njure	hypofys	tymus
cekum	tårkörtel (exorbital)	prostata	sköldkörtel
cervix	lever	rektum	[tunga]
koagulerande körtel	lunga	spottkörtel	trakea
kolon	lymfkörtlar (både ytliga och djupa)	sädesblåsa	urinblåsa

▼**M4**

tolvfingertarm	bröstkörtel (obligatorisk för honor, och om synlig och dissekeringsbar hos hanar)	skelettmuskel	uterus (inklusive cervix)
bitestikel	[övre luftvägarna, inklusive nos, turbinates och bihålorna]	hud	[ureter]
öga (inklusive näthinna)	esofagus	ryggmärg (på tre nivåer: cervikal, mitt på bröstkorgen och ländryggen)	[uretra]
[lårben med led]	[luktbulb]	mjälte	vagina
gallblåsa (för andra arter än råtta)	äggstock	[bröstben],	snitt av ryggmärgen och/eller ett färskt benmärgsaspirat
Harderiankörtel			

När det gäller parvisa organ t.ex. njure, binjure, bör båda organen bevaras. Kliniska och andra fynd kan indikera behovet av att undersöka ytterligare vävnader. Alla organ som sannolikt är målorgan, baserat på kunskap om testkemikaliens egenskaper, ska också konserveras. I studier som inbegriper administrering via huden bör listan på organ som anges för oralt intag undersökas, och det är nödvändigt med särskild provtagning och bevarande av huden där appliceringen har skett. I inhalationsstudier bör förteckningen över bevarade och undersökta vävnader från luftvägarna följa rekommendationerna i kapitel B.8 (8) och kapitel B.29 i denna bilaga (9). För andra organ/vävnader (och i tillägg till de specifikt bevarade vävnaderna från luftvägarna) bör de organ som finns i förteckningen som anges för den orala vägen undersökas.

Histopatologi

56. Vägledning finns tillgänglig om bästa praxis vid genomförande av studier gällande toxikologisk patologi (40). De vävnader som minst ska undersökas är:

— Alla vävnader från högdos- och kontrollgrupperna.

— Alla vävnader från djur som dör eller avlivas under studien.

— Alla vävnader som uppvisar makroskopiska abnormaliteter, inklusive tumörer.

— När behandlingsrelaterade histopatologiska förändringar observeras i högdosgruppen, ska samma vävnader från samtliga djur i alla andra dosgrupper undersökas,

— När det gäller parvisa organ t.ex. njure, binjure, bör båda organen undersökas.

▼M4

DATA OCH RAPPORTERING (KARCINOGENICITET OCH KRONISK TOXICITET)

Data

57. Individuella data för samtliga utvärderade parametrar bör ges. Därutöver bör alla data sammanfattas i tabellform, som för varje testgrupp visar antal djur vid testets början, antal djur som påfanns döda under testet eller som avlivats av humanitära skäl och tidpunkten för dödsfallen eller avlivningen, antal djur som visar tecken på toxicitet, en beskrivning av de tecken på toxicitet som observerats, inklusive tidpunkt för de första tecknen, varaktighet och hur allvarliga de toxiska verkningarna är, antal djur som uppvisar skador, typ av skador och procentandelen djur för varje typ av skada. Sammanfattande tabeller bör ge medelvärden och standardavvikelser (för kontinuerliga testdata) för djur som uppvisar toxiska effekter eller skador, i tillägg till skadornas gradering.

58. Historiska kontrolldata kan vara värdefulla vid tolkningen av studiens resultat, t.ex. i de fall då det finns indikationer på att de data som lämnats från de parallella kontrollerna i huvudsak avviker jämfört med aktuell data från kontrolldjuren från samma testanläggning/-koloni. Historiska kontrolldata, om de har utvärderats, bör lämnas in från samma laboratorium och relatera till djur i samma ålder och av samma stam som genererats under de fem år som föregick studien i fråga.

59. När det är tillämpligt bör numeriska resultat utvärderas genom en lämplig och allmänt vedertagen statistisk metod. Vid utformningen av studien bör de statistiska metoderna och datan som ska analyseras väljas (punkt 9). Valet bör innehålla bestämmelser om överlevnadsjusteringar, där så krävs.

60. Testrapporten ska omfatta följande information:

Testkemikalie:

— Fysikalisk natur, renhet och fysikalisk-kemiska egenskaper.

— Identifikationsuppgifter.

— Kemikaliens källa.

— Satsnummer.

— Intyg om kemisk analys.

Vehikel (i förekommande fall):

— Motivering för val av vehikel (om annan än vatten).

Försöksdjur:

— Art/stam som används och motivering av valet.

— Djurens antal, ålder och kön vid testets början.

— Ursprung, inhysning, kost etc.

— Djurens individuella vikt vid testets början.

▼**M4**

Försöksbetingelser:

— Grund för administreringssätt och dosval.

— I förekommande fall, de statistiska metoderna som använts för att analysera datan.

— Uppgifter om testkemikaliens sammansättning/foderberedning.

— Analysdata om beredningens uppnådda koncentration, stabilitet och homogenitet.

— Administreringssätt och uppgifter om testkemikaliens administrering.

— Om enbart nos eller helkropp vid inhalationsstudier.

— Faktiska doser (mg/kg kroppsvikt/dag) och omräkningsfaktor för kostens/dricksvattnets testkemikaliekoncentration (mg/kg eller ppm) till den faktiska dosen, om tillämpligt.

— Uppgifter om foder- och vattenkvalitet.

Resultat (sammanfattande data i tabellform och enskilda djurdata ska presenteras):

Allmänt

— Överlevnadsdata.

— Kroppsvikt/kroppsviktsförändringar.

— Foderförbrukning, beräkningar av fodereffektivitet, om det har utförts, och vattenförbrukning, om tillämpligt.

— Toxikokinetiska data, i förekommande fall.

— Oftalmoskopi (om tillgängligt).

— Hematologi (om tillgängligt).

— Klinisk kemi (om tillgängligt).

Kliniska fynd

— Tecken på toxicitet.

— Förekomst (och allvarlighetsgrad) av eventuell abnormitet.

— Art, allvarlighetsgrad och varaktighet för kliniska observationer (huruvida de är övergående eller permanenta).

Obduktionsdata

— Terminal kroppsvikt.

— Organvikter och deras förhållanden, om tillämpligt.

— Obduktionsfynd, abnormaliteternas förekomst och allvarlighetsgrad.

Histopatologi

— Icke-neoplastiska histopatologiska fynd.

— Neoplastiska histopatologiska fynd.

▼M4

— Sambandet mellan grova och mikroskopiska fynd.

— Detaljerad beskrivning av alla behandlingsrelaterade histopatologiska fynd, inklusive allvarlighetsgradering.

— Rapport över eventuell inbördes granskning av bilder.

Statistisk bearbetning av resultaten, när så är lämpligt

Diskussion av resultaten, inklusive:

— Diskussion om eventuella modellstrategier.

— Dos:responsförhållanden.

— Historiska kontrolldata.

— Beaktande av eventuell information om verkningssätt.

— BMD-, NOAEL- eller LOAEL-bestämning.

— Relevans för människor.

Slutsatser

LITTERATUR

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

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

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

(4) Barlow SM, Greig JB, Bridges JW et al (2002). Hazard identification by methods of animal-based toxicology. Food. Chem. Toxicol. 40: 14–191.

(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 denna bilaga, test avseende subkronisk oral toxicitet (90 dagars upprepat oraltest på icke-gnagare).

(7) OECD (2012). Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 and 453 – Second edition. Series on Testing and Assessment No. 116, tillgänglig på OECD:s offentliga webbplats för vägledningar för tester 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 denna bilaga, subakut inhalationstoxicitet: 28-dagars studie.

(10) Kapitel B.29 i denna bilaga, subkronisk inhalationstoxicitet: 90-dagars studie.

(11) Kapitel B.9 i denna bilaga, toxicitet vid upprepad dosering (28 dagar, dermalt).

▼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 and Lumley CE (1994). The utility of the second rodent species in the carcinogenicity testing of pharmaceuticals. The Toxicologist 14(1):214.

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

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

▼**M4**

(27) Europaparlamentets och rådets direktiv 2010/63/EU av den 22 september 2010 om skydd av djur som används för vetenskapliga ändamål, EUT L 276, 20.10.2010, s. 33–79.

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

(29) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, December, 1989). Publication on the Planning and Structure of Animal Facilities for Institutes Performing Animal Experiments. ISBN 3-906255-06-9.

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

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

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

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

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

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

(36) Meyer OA, Tilson HA, Byrd WC, Riley MT (1979). A Method for the RoutineAssessment of Fore- and 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 (draft) document ”Non-clinical guideline on drug-induced hepatotoxicity” (Doc. Ref. EMEA/CHMP/SWP/a50115/2006).

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

▼**M4**

Tillägg 1

DEFINITION

Testkemikalie: Alla ämnen eller blandningar som testas med denna testmetod.

▼B

B.34 **REPRODUKTIONSTOXICITETSTEST PÅ EN GENERATION**

1. **METOD**

1.1 INLEDNING

Se allmän inledning till del B.

1.2 DEFINITIONER

Se allmän inledning till del B.

1.3. REFERENSÄMNEN

Inga.

1.4 TESTMETODSPRINCIP

Testämnet tillförs i graderade doser till flera grupper av handjur och hondjur. Handjuren bör tillföras ämnet under tillväxtperioden och under minst en fullständig spermiebildande cykel (ca 56 dagar för mus och 70 dagar för råtta) för att framkalla eventuella hälsomässiga oönskade verkningar som testämnet kan ha på spermatogenes.

Hondjur i föräldra(F_o)generationen tillförs testämnet under minst två fullständiga brunstighetscykler för att framkalla eventuella skadliga verkningar som testämnet kan ha på brunsten. Därefter paras djuren. Båda kön tillförs testämnet under parningsperioden, och därefter tillförs endast hondjuren testämnet under dräktighetsperioden och diperioden. Vid tillförsel genom inhalation måste metoden anpassas.

1.5 KVALITETSKRITERIER

Inga.

1.6 METODBESKRIVNING

Förberedelser

Före försöket fördelas friska unga djur slumpmässigt i behandlings- och kontrollgrupper. I minst fem dagar före försöket ska djuren hållas under testbetingelser vad beträffar miljö och utfodring. Det rekommenderas att testämnet tillförs via fodret eller dricksvattnet. Andra tillförselvägar är också godtagbara Samma tillförselmetod ska användas för alla djur under hela behandlingsperioden. Om vehikel eller annan tillsats används för att underlätta doseringen ska det vara fastställt att den inte framkallar några toxiska verkningar. Djuren bör tillföras testämnet sju dagar i veckan.

▼B

Försöksdjur

Val av djurart

I första hand ska råttor och möss användas. Unga friska djur, som inte tidigare har använts i försök, ska användas. Stammar med låg fertilitet bör inte användas. Försöksdjuren bör vara representativa för sin art, stam, kön, vikt och/eller ålder.

För att korrekt kunna bedöma fertiliteten ska både han- och hondjur testas. Alla försöks- och kontrolldjur ska vara avvanda innan dosering inleds.

Antal och kön

Varje behandlings- och kontrollgrupp ska bestå av ett tillräckligt högt antal djur för att resultera i omkring 20 dräktiga hondjur som är nära eller vid födslotidpunkten.

Syftet med detta är att säkerställa att det föds tillräckligt många ungar för att säkerställa en meningsfull utvärdering av hur testämnet kan påverka fertiliteten, dräktigheten och moderdjurens beteende i F_0-generationen samt diandet, tillväxten och utvecklingen i F_1-generationen från nedkomsten till avvänjning.

Försöksbetingelser

Foder och vatten ges ad libitum. När födslotidpunkten närmar sig placeras de dräktiga hondjuren i var sin födslo- eller dräktighetsbur och djuren kan eventuellt förses med material för att bygga bo.

Dosnivåer

Minst tre olika dosnivågrupper samt en kontrollgrupp ska användas. Om vehikel används för tillförsel av testämnet ska kontrollgruppen tillföras samma mängd vehikel som högdosgruppen. Om ett testämne leder till ett minskat foderintag eller påverkar absorption eller metabolism kan det vara nödvändigt att använda en motsvarande restriktivt utfodrad kontrollgrupp. Såvida det inte finns några begränsningar till följd av testämnets fysikaliska-kemiska eller biologiska egenskaper bör den högsta dosen idealt förorsaka toxiska verkningar, men inte dödsfall i föräldra(F_0)-generationen. Medeldosnivåerna (eventuellt flera) bör framkalla minsta möjliga observerbara toxiska verkningar som orsaktas av testämnet, och den lägsta dosen bör inte ha någon toxisk effekt på föräldragenerationen eller avkomman. Om ämnet tillförs via magsond eller i kapsel bör den dos som varje enskilt djur mottar beräknas på grundval av djurets kroppsvikt och varje vecka justeras med hänsyn till förändringar i kroppsvikt. Doser som tillförs dräktiga hondjur kan beräknas efter kroppsvikt vid dag 0 eller 6 av dräktigheten, om så önskas.

Gränstest

Om ett testämne med låg toxicitet i en dosnivå på 1 000 mg/kg kroppsvikt inte har någon påverkan på reproduktionen kan ytterligare tester anses vara överflödiga. Om en inledande undersökning, i vilken endast den högsta dosen används, klart visar på toxisk verkan på moderdjuren, men inte har någon skadlig verkan på fertiliteten, kan ytterligare tester anses vara överflödiga.

▼B

Förfarande

Försöksschema

Daglig dosering av föräldra(F_0)-generationen inleds när djuren är mellan fem och nio veckor gamla, och efter det att de är avvanda och har acklimatiserat sig i minst fem dagar. Om råttor används fortsätter doseringen i tio veckor före parningsperioden (för möss åtta veckor). Handjuren bör avlivas och undersökas antingen vid slutet av parningsperioden eller så kan man fortsätta att tillföra dem testämnet fram till en eventuell produktion av en andra kull, varefter de avlivas och undersöks någongång före försökets avslutning. Dosering av föräldra(F_0)-generationens hondjur inleds efter minst fem dagars acklimatisering och fortsätter under minst två veckor före parning. Daglig dosering av föräldra(F_0)-generationens hondjur fortsätter under den tre veckor långa parningsperioden, under dräktighetsperioden och fram till det att F_1-generationen är avvand. Man bör överväga eventuella justeringar av försöksschemat om det föreligger uppgifter om testämnet, t.ex. induktion av metabolism eller bioackumulering.

Parning

Parning kan utföras i förhållandet 1:1 (ett handjur till ett hondjur) eller 1:2 (ett handjur till två hondjur) i undersökningar av reproduktionstoxicitet.

Om parning i förhållandet 1:1 används förs ett handdjur och ett hondjur samman tills dräktighet inträffar eller tre veckor har förflutit. Varje morgon ska hondjuren undersökas för närvaron av spermier eller vaginalproppar. Som dag 0 i dräktighetsperioden räknas den dag då man observerar en vaginalpropp eller sperma.

De par som inte parar sig bör undersökas för att fastställa orsaken till den påtagliga ofruktsamheten.

Detta kan göras genom att djuren t.ex. får möjlighet att para sig med han- eller hondjur vars fruk-barhet är fastställd, genom mikroskopisk undersökning av reproduktionsorganen och genom undersökning av brunstighetsperioden eller speratogenes.

Kull storlekar

De djur som doseras i fertilitetsundersökningen bör ha möjlighet att föda normalt och att behålla sin avkomma tills den är avvand utan standardisering av kullar.

Om kullar standardiseras föreslås följande förfarande: Mellan dag 1 och 4 efter födseln standardiseras varje kull genom att extra ungar avlägsnas så att varje kull så långt det är möjligt består av fyra handjur och fyra hondjur.

Om det på grund av antalet han- och hondjur inte är möjligt att standardisera varje kulle att de innehåller fyra handjur och fyra hondjur kan en delvis standardisering godkännas (t.ex. fem handjur och tre hondjur). Ingen standardisering ska ske på kullar som består av mindre än åtta ungar.

▼B

Observationer

Djuren ska inspekteras minst en gång om dagen under hela försöket. Relevanta beteendeförändringar, tecken på svårartad eller förlängd födsel och alla toxicitetstecken, inbegripet dödlighet, ska registreras. Före och under parningstiden registreras foderintaget en gång i veckan. Efter födseln och under diperioden ska foderintaget (och vattenkonsumtionen om testämnet tillförs via dricksvattnet) mätas varje vecka. Han- och hondjur av F_0-generationen vägs den dag då doseringen inleds och därefter en gång i veckan. Dessa observationer bör rapporteras individuellt för varje enskilt djur.

Dräktighetsperioden beräknas från dag 0. Varje kull undersöks så snart som möjligt efter födseln för att fastställa ungarnas antal och kön, antal dödfödda och levande ungar och förekomsten av makroskopiskt synliga abnormiteter.

Döda ungar och ungar som avlivas dag 4 ska bevaras och undersökas för eventuella defekter. Levande ungar ska räknas och kullen vägas morgonen efter födseln, på dag 4 och dag 7 och därefter en gång i veckan tills försöket avslutats då djuren ska vägas individuellt.

Fysiska eller beteendemässiga abnormiteter som observeras i hondjuret eller avkomman ska registreras.

Patologisk undersökning

Makroskopisk undersökning

F_0-generationsdjur som avlivas efter eller dör under försöket ska undersökas makroskopiskt för strukturella abnormiteter eller patologiska förändringar, med särskilt uppmärksamhet riktad mot organen i reproduktionssystemet. Döda eller döende ungar ska undersökas för defekter.

Histopatologisk undersökning

Äggstockar, livmoder, livmoderhals, slida, testiklar, bitestiklar, sädesblåsa, prostata, koagulerings-körtlar, hypofys och målorgan (eventuellt flera) från alla djur i F_0-generationen ska bevaras för mikroskopisk undersökning. Om dessa organ inte har undersökts i andra försök med multipel dosering ska organen från djuren i högdos- och kontrollgrupperna, samt de djur som dör under försöket, undersökas mikroskopiskt om detta är praktiskt möjligt.

De organ från dessa djur som uppvisar abnormiteter ska även undersökas hos alla andra djur i F_0-generationen. I dessa fall ska alla vävnader som uppvisar makroskopiska patologiska förändringar undersökas mikroskopiskt. Liksom det föreslås i parningsavsnittet kan även reproduktionsorganen från djur som antas vara ofruktsamma undersökas mikroskopiskt.

▼B

2. **DATA**

Data ska ställas upp i tabellform och för varje grupp anges antal djur i början av försöket, antal fertila handjur, antal dräktiga hondjur, slag av förändring och den procent djur som upvisar varje slag av förändring.

Utvärderingen av resultaten ska om möjligt grundas på en lämplig statistisk metod. Alla erkända statistiska metoder får användas.

3. **RAPPORTERING**

3.1 TESTRAPPORT

Testrapporten ska om möjligt innehålla minst följande uppgifter:

— Djurart, stam.

— Uppgifter om toxisk reaktion uppdelade efter kön och dos, inbegripet fertilitet, dräktighet och avkommans livsduglighet.

— Tidpunkten för dödsfall under försöket eller överlevnad till slutet av försöket eller tidpunkt för planenlig avlivning.

— Tabell med angivelse av vikten för varje enskild kulle, ungarnas genomsnittsvikt och varje enskild unges vikt vid försökets avslutning.

— Toxiska och andra verkningar på reproduktion, avkomma, postnatal tillväxt.

— Tidpunkten för observation av varje abnormalt tecken och dess senare utveckling.

— Uppgifter om foder och kroppsvikt för F_0-generationen.

— Obduktionsrön.

— Detaljerad beskrivning av alla mikroskopiska rön.

— Eventuell satistisk behandling av resultaten i lämpliga fall.

— Diskussion om resultaten.

— Tolkning av resultaten.

3.2 UTVÄRDERING OCH TOLKNING

Se allmän inledning till del B.

4. **HÄNVISNINGAR**

Se allmän inledning till del B.

▼B

B.35 TEST AVSEENDE REPRODUKTIONSTOXICITET PÅ TVÅ GENERATIONER

1. METOD

Denna metod är i stort sett identisk med OECD TG 416 (2001).

1.1 INLEDNING

Denna metod för test avseende reproduktionstoxicitet på två generationer har som syfte att ge allmän information om ett testämnes verkningar på integriteten och prestanda hos hondjurs och handjurs reproduktionssystem, inklusive körtelfunktion, brunstighetscykel, parningsbeteende, befruktning, dräktighet, födsel, diperiod och avvänjning samt avkommans tillväxt och utveckling. Testet kan också ge information om testämnets verkningar på neonatal morbiditet och mortalitet, preliminära data om prenatal och postnatal utvecklingstoxicitet samt vägledning för senare test. Utöver undersökning av tillväxt och utveckling hos F1-generationen är testmetoden också avsedd för bedömning av integritet och prestanda hos hondjurs och handjurs reproduktionssystem samt F2-generationens tillväxt och utveckling. För att erhålla ytterligare information om utvecklingstoxicitet och funktionsstörningar kan segment med tilläggstest införlivas i detta protokoll, där metoderna för utvecklingstoxicitet eller utvecklingsneurotoxicitet används. Alternativt kan dessa endpoints undersökas i separata test där lämpliga testmetoder används.

1.2 PRINCIP FÖR TESTMETODEN

Testämnet tillförs i graderade doser till flera grupper av handjur och hondjur. Handjur i P-generationen bör tillföras ämnet under tillväxtperioden och under minst en fullständig spermiebildande cykel (cirka 56 dagar för mus och 70 dagar för råtta) för att framkalla eventuella skadliga verkningar på spermatogenesen. Verkningarna på sperman bestäms genom ett antal spermaparametrar (t.ex. spermans morfologi och motilitet), genom undersökning av vävnadspreparat och genom detaljerad histopatologi. Om data om spermatogenesen finns att tillgå från tidigare tillräckligt långa test med upprepad dos, t.ex. ett 90-dagars test, behöver P-generationens handjur inte inkluderas i utvärderingen. Det rekommenderas dock att prover eller digitala registreringar av P-generationens sperma bevaras, så att senare utvärderingar vid behov kan göras. P-gene-rationens hondjur bör ges doser under tillväxten och under flera fullständiga brunstighetscykler för att framkalla eventuella skadliga verkningar av testämnet på brunstighetscykelns normalitet. Testämnet tillförs föräldradjuren (P) under parningsperioden, under dräktighetsperioden och under F1-avkommans hela avvänjningsperiod. Efter avvänjningen tillförs testämnet fortsättningsvis till F1-avkomman under tillväxtperioden och under perioden för parning och produktion av en F2-generation, fram till det att F2-generatio-nen är avvand.

Kliniska observationer och patologiska undersökningar görs på alla djur med avseende på toxicitetstecken, med särskild tonvikt på verkningarna på integriteten och prestanda hos hondjurens och handjurens reproduktionssystem och på avkommans tillväxt och utveckling.

▼B

1.3 BESKRIVNING AV TESTMETODEN

1.3.1 **Val av djurart**

Rekommenderat testdjur är råtta. Om andra arter används bör detta motiveras och testmetoden måste modifieras på tillbörligt sätt. Stammar med låg fertilitet eller välkänd hög incidens av utvecklingsdefekter ska inte användas. Vid testets början bör variationen i vikt mellan djuren vara minimal och får inte överstiga 20 % av vardera könets medelvikt.

1.3.2 **Förvarings- och utfodringsbetingelser**

Temperaturen i testdjurens utrymmen bör vara 22 °C (± 3°). Den relativa fuktigheten bör vara minst 30 % och ska helst inte överstiga 70 %, utom när rummet rengörs. Målvärdet bör dock vara 50–60 %. Belys-ningen bör vara artificiell med omväxlande 12 timmar ljus och 12 timmar mörker. För utfodringen kan konventionellt laboratoriefoder användas, och djuren bör ha obegränsad tillgång till dricksvatten. Valet av foder kan påverkas av behovet att säkerställa att en lämplig blandning med testämnet fås, om man har valt denna tillförselmetod.

Djuren kan inhysas individuellt eller i burar med små grupper av samma kön. För parningsprocedurerna används burar som är lämpliga för ändamålet. Efter tecken på kopulation flyttas de parade hondjuren till var sin födslo- eller maternitetsbur. Parade råttor kan också hållas i små grupper och separeras en eller två dagar före födseln. När tidpunkten för födsel närmar sig ska de parade djuren ges lämpliga och definierade material för beredning av ett bo.

1.3.3 **Förberedelse av djuren**

För testet används unga friska djur som har acklimatiserats till laboratoriemiljön under minst fem dagar och som inte har använts för tidigare test. Testdjuren karakteriseras enligt art, stam, ursprung, kön, vikt och ålder. Alla syskonförhållanden mellan djuren bör vara kända så att parning mellan sådana djur kan undvikas. Djuren fördelas slumpmässigt i kontroll- och behandlingsgrupper (stratifiering enligt kroppsvikt rekommenderas). Burarna placeras i sådan ordning att eventuella verkningar på grund av placeringen mini-meras. Varje djur förses med ett unikt identifieringsnummer. För P-generationen bör detta göras innan tillförseln av testämnet inleds. För F1-generationen bör detta göras efter avvänjningen av de djur som har valts för parning. För alla utvalda F1-djur bör uppgifter registreras om vilken kull de härstammar från. Dessutom rekommenderas att ungarna identifieras individuellt så snart som möjligt efter födseln, i fall där individuell vägning av ungar eller funktionstest övervägs.

Föräldradjuren (P) bör vara 5–9 veckor gamla när tillförseln av testämnet inleds. Djuren i alla testgrupper bör vara så lika som möjligt med avseende på vikt och ålder.

▼B

1.4 FÖRFARANDE

1.4.1 **Djurens antal och kön**

Varje behandlings- och kontrollgrupp ska bestå av så många djur att det nära eller vid tidpunkten för födseln helst finns minst 20 dräktiga hondjur. I fråga om ämnen som förorsakar oönskade behandlingsrelaterade verkningar (t.ex. sterilitet, övertoxicitet vid den höga dosen) är detta kanske inte möjligt. Syftet är att få ett tillräckligt antal dräktigheter för att säkerställa en meningsfull utvärdering av testämnets potential att påverka fertiliteten, dräktigheten och moderdjurens beteende samt diandet, tillväxten och utvecklingen hos F1-avkomman från befruktning till mognad och utvecklingen av dennas avkomma (F2) till avvänjning. Om det önskade antalet dräktiga djur (dvs. 20) inte erhålls, behöver testet således inte nödvändigtvis förkastas, utan detta bör bedömas från fall till fall.

1.4.2 **Förberedelse av doserna**

Det rekommenderas att testämnet tillförs oralt (med fodret, dricksvattnet eller genom sondmatning), utom om någon annan tillförselväg (t.ex. via huden eller genom inandning) bedöms vara lämpligare.

Vid behov kan testämnet upplösas eller suspenderas i en lämplig vehikel. Om möjligt bör man i första hand överväga vattenlösning eller vattensuspension, sedan oljelösning eller oljeemulsion (t.ex. majsolja) och därefter eventuellt andra vehiklar. I fråga om andra vehiklar än vatten måste de toxiska egenskaperna vara kända. Testämnets stabilitet i vehikeln bör fastställas.

1.4.3 **Dosering**

Minst tre dosnivåer och en parallell kontrollgrupp bör användas. Den högsta dosnivån väljs så att den framkallar toxiska verkningar men inte dödsfall eller allvarligt lidande, förutsatt att det inte finns begränsningar som beror på testämnets fysikalisk-kemiska natur eller biologiska verkningar. I fall av oväntad mortalitet kan testet i regel ändå godkännas, så länge som mortalitetsgraden är lägre än cirka 10 procent hos föräldradjuren (P). Därefter väljs dosnivåerna i fallande skala så att dosrelaterade verkningar kan påvisas. En nivå bör väljas så att inga påvisbara skadliga verkningar (NOAEL) uppstår. Två- till fyrfaldiga dosintervall är ofta optimala för de fallande dosnivåerna. Tillägg av en fjärde testgrupp är att föredra framför användning av mycket breda intervall mellan dosnivåerna (t.ex. en faktor som överstiger cirka 10). För utfodringstest bör dosintervallet inte vara mer en trefaldigt. Dosnivåerna bör väljas med hänsyn till kända toxicitetsdata, särskilt resultat från test med upprepad dos. Likaså bör hänsyn tas till känd information om metabolism och kinetik för testämnet eller närbesläktade material. Denna information är också till hjälp när det gäller att demonstrera lämpligheten hos dossystemet.

▼B

Kontrollgruppen ska vara en obehandlad grupp eller en vehikelkontrollgrupp, om vehikel används för tillförsel av testämnet. Med undantag för behandling med testämnet bör djuren i kontrollgruppen hanteras på exakt samma sätt som djuren i dosgrupperna. Om en vehikel används bör kontrollgruppen få vehikeln i den största volym som används. Om testämnet tillförs med fodret och detta leder till minskat foderintag eller minskad foderanvändning, kan det vara nödvändigt med en parallellt utfodrad kontrollgrupp. Alternativt kan man i stället för en sådan kontrollgrupp använda data från kontrollerade test för utvärdering av hur ett minskat foderintag påverkar reproduktionsparametrarna.

Följande egenskaper hos vehikeln och övriga eventuella tillsatsämnen bör i tillämplig mån beaktas: Verkningarna på absorption, distribution, metabolism eller kvarhållande av testämnet, verkningarna på testämnets kemiska egenskaper till den del dessa verkningar kan påverka testämnets toxiska egenskaper samt verkningarna på testdjurens foder- eller vattenintag eller deras näringstillstånd.

1.4.4 **Gränstest (Limit-test)**

Om ett oralt test med en dosnivå om minst 1 000 mg/kg kroppsvikt per dag (eller, om testämnet tillförs med foder eller dricksvatten, en motsvarande procenthalt i foder eller dricksvatten med användning av de förfaranden som beskrivs för detta test) inte leder till några observerbara toxiska verkningar varken hos för-äldradjuren eller deras avkomma, och om toxicitet inte kan förväntas på grundval av data från strukturellt eller metaboliskt närbesläktade ämnen, kan ett fullständigt test med flera dosnivåer bedömas vara överflödigt. Detta gränstestkriterium är tillämpligt förutom i fall där sannolik exponering på människor indikerar att en högre oral dosnivå behövs. För andra former av tillförsel, såsom inandning eller applicering på huden, kan testämnets fysikalisk-kemiska egenskaper, såsom löslighet, ofta indikera och begränsa den maximala exponeringsnivån.

1.4.5 **Tillförsel av doser**

Djuren ska ges doser av testämnet alla dagar i veckan. Tillförsel på oral väg (foder, dricksvatten eller sond-matning) rekommenderas. Om någon annan tillförselväg används måste detta motiveras och tillbörliga justeringar kan vara nödvändiga. Samma tillförselmetod ska användas för alla djur under den valda testperioden. Om testämnet tillförs genom sondmatning bör magsond användas. Den volym vätska som tillförs på en och samma gång får inte överskrida 1 ml per l00 g kroppsvikt (0,4 ml per 100 g kroppsvikt om majsolja används), utom för vattenlösningar där volymen kan uppgå till 2 ml per 100 g kroppsvikt. Med undantag för irriterande eller frätande ämnen som normalt ger kraftigare verkan med högre koncentration bör variationer i testvolym minimeras genom justering av koncentrationen, för att säkerställa en konstant volym på alla dosnivåer. Om tillförsel genom sondmatning används får ungarna normalt testämnet endast indirekt genom mjölken, tills direkt tillförsel inleds efter avvänjningen. Om tillförsel via foder eller vatten används kommer ungarna dessutom att få testämnet direkt så snart de börjar äta själva under den sista veckan av diperioden.

▼B

För ämnen som tillförs via fodret eller dricksvattnet är det viktigt att försäkra sig om att testämnet ges i mängder som inte stör det normala näringsupptaget eller den normala vattenbalansen. Testämne som tillförs via fodret kan ges som en konstant koncentration (ppm) eller en konstant dosnivå i förhållande till djurens kroppsvikt. Det använda alternativet ska anges. Testämne som tillförs genom sondmatning bör ges vid samma tid varje dag, och justeras minst varje vecka så att dosnivån hålls konstant i förhållande till djurens kroppsvikt. Informationen om placentadistribution bör beaktas när sondmatade doser justeras enligt vikten.

1.4.6 **Testschema**

Daglig dosering av föräldragenerationen (P) inleds när djuren är mellan fem och nio veckor gamla. Daglig dosering av F1-generationens han- och hondjur inleds efter avvänjningen. Om testämnet tillförs med fodret eller dricksvattnet bör hänsyn tas till att F1-ungarna redan under diperioden kan utsättas för direkt exponering av testämnet. Tillförseln ska fortsätta för båda könen (P och F1) under minst 10 veckor före parningsperioden. Tillförseln fortsätts för båda könen under den två veckor långa parningsperioden. Handjuren avlivas humant och undersöks när de inte längre behövs för bedömningen av reproduktionstoxiska verkningar. Tillförseln till föräldragenerationens (P) hondjur fortsätts under hela dräktigheten och fram till det att F1-avkomman har avvants. Eventuella justeringar av testschemat bör övervägas om känd information om testämnet indikerar detta, t.ex. toxicitetsdata, induktion av metabolism eller bioackumulering. Dosen till varje djur bör i regel basera sig på den senaste bestämningen av djurets kroppsvikt. Försiktighet bör dock iakttas när dosen justeras under dräktighetens sista tredjedel.

Behandlingen av P- och F1-generationens handjur och hondjur fortsätts fram till det att testet avslutas. Alla P- och F1-generationens handjur och hondjur avlivas humant när de inte längre behövs för bedömningen av reproduktionstoxiska verkningar. F1-avkomma som inte väljs ut för parning och all F2-avkomma avlivas humant efter avvänjningen.

1.4.7 **Parning**

1.4.7.1 *Parning i föräldragenerationen (P)*

För parningen sammanförs ett hondjur med ett ensamt handjur från samma dosnivå (parning i förhållandet 1:1) tills kopulation inträffar eller 2 veckor har gått. Hondjuren undersöks varje dag för närvaron av sperma eller vaginalproppar. Som dräktighetens dag 0 räknas den dag då en vaginalpropp eller sperma observeras. Om parningen inte lyckas kan man överväga ett nytt parningsförsök där hondjuret sammanförs med ett handjur med fastställd fertilitet från samma grupp. De djur som har parat sig bör identifieras entydigt i testets data. Parning av syskon bör undvikas.

▼B

1.4.7.2 *F1-parning*

För parning av F1-avkomman väljs minst ett handjur och ett hondjur från varje kull efter avvänjningen, vilka korsas med ungar ur en annan kull på samma dosnivå. På detta sätt produceras F2-generationen. Ungarna väljs ut slumpmässigt ur varje kull i fall där inga signifikanta skillnader kan observeras rörande kroppsvikt eller utseende mellan ungarna i en kull. Om skillnader kan observeras bör de djur som bäst representerar kullen väljas ut. I praktiken görs detta bäst på grundval av kroppsvikt, även om det i vissa fall kan vara lämpligare att använda utseendet som grund. F1-avkomman ska inte paras förrän den har nått fullständig sexuell mognad.

Par utan avkomma ska undersökas i syfte att fastställa uppenbara orsaker till infertiliteten. Detta kan göras t.ex. genom att djuren får möjlighet att para sig med han- eller hondjur vars fertilitet är fastställd, genom mikroskopisk undersökning av reproduktionsorganen eller genom undersökning av brunstighetspe-rioden eller spermatogenesen.

1.4.7.3 *Andra parningen*

I vissa fall, t.ex. vid behandlingsrelaterade förändringar i kullstorlek eller om entydig effekt av den första parningen inte kan observeras, rekommenderas att vuxna P- eller F1-djur får para sig på nytt för att producera en ny kull. För denna andra parning rekommenderas korsning av djur som inte har producerat någon kull, med hondjur och handjur vars fertilitet är fastställd. Om en ny kull bedöms vara nödvändig i någondera generationen, bör den andra parningen ske cirka en vecka efter det att föregående kull har avvants.

1.4.7.4 *Kullstorlek*

Djuren får föda normalt och hålla sin avkomma tills den är avvand. Standardisering av kullarna är inte obligatorisk. Om standardisering görs, bör den metod som används beskrivas i detalj.

1.5 OBSERVATIONER

1.5.1 **Kliniska observationer**

En allmän klinisk observation bör göras varje dag. Om testämnet tillförs genom sondmatning bör observationstidpunkten väljas med beaktande av perioden för när maximala verkningar förväntas efter tillförseln. Avvikande beteende, tecken på svår eller förlängd födsel och alla tecken på toxicitet bör registreras. Dessutom bör alla djur inspekteras närmare minst en gång per vecka, lämpligen i samband med vägningen. Två gånger per dag (under veckosluten en gång per dag, om lämpligt) bör alla djur inspekteras för morbiditet och mortalitet.

▼B

1.5.2 **Föräldradjurens kroppsvikt samt foder- och vattenkonsumtion**

Föräldradjuren (P och Fl) ska vägas på den första doseringsdagen och därefter minst varje vecka. Föräldragenerationernas hondjur (P och F1) ska vägas minst på dräktighetsdagarna 0, 7, 14 och 20 eller 21, under diperioden på samma dagar då kullarna vägs och slutligen på den dag då djuren avlivas. Dessa observationer bör rapporteras individuellt för varje vuxet djur. Före parningen och under diperioden ska foderkonsumtionen mätas minst varje vecka. Vattenkonsumtionen ska mäta minst varje vecka om testämnet tillförs med vattnet.

1.5.3 **Brunstighetscykel**

Brunstighetscykelns längd och normalitet utvärderas hos P- och F1-hondjuren genom vaginala smear-test före parningen och eventuellt under parningsperioden fram till det att tecken på parning kan observeras. Tagningen av vaginala eller cervikala celler bör göras med försiktighet för att undvika störningar på slemhinnan och induktion av skendräktighet (1).

1.5.4 **Spermaparametrar**

Vid testets slut registreras för alla P- och F1-handjur vikten för testiklar och bitestiklar. Ett exemplar av varje organ bör bevaras för histopatologisk undersökning (se avsnitt 1.5.7, 1.5.8.1). Återstående testiklar och bitestiklar från en undergrupp med minst tio handjur från varje grupp av P- och F1-handjur används för räkning av homogeniseringsresistenta spermatider respektive cauda epididymala spermareserver. Från samma undergrupp av handdjur insamlas sperma från cauda epididymis eller vas deferens för utvärdering av spermans motilitet och morfologi. Om behandlingsrelaterade verkningar observeras eller om resultaten från andra test tyder på verkningar på spermatogenes, ska sperman utvärderas för alla handjur i varje dosgrupp. I annat fall kan räkningen begränsas till P- och F1-handjuren i kontroll- och högdosgruppen.

Totalantalet homogeniseringsresistenta testikulära spermatider och cauda epididymala spermier bör räknas (2)(3). Cauda-spermareserverna kan härledas från koncentrationen och volymen hos sperman i den suspension som används för de kvalitativa bedömningarna och från antalet spermier som räknats efter påföljande malning eller homogenisering av återstående cauda-vävnad. Räkningen bör utföras omedelbart efter avlivningen för den valda undergruppen av handjur från alla dosgrupper. Undantag till detta är om man gör video- eller digitalregistreringar eller om proverna djupfryses och analyseras senare. I sådana fall kan kontroll- och högdosgruppen analyseras först. Om inga behandlingsrelaterade verkningar (t.ex. på spermiernas antal, motilitet eller morfologi) kan observeras, behöver de övriga dosgrupperna inte analyseras. Om behandlingsrelaterade verkningar kan observeras i högdosgruppen bör även grupperna med lägre doser utvärderas.

▼B

Motiliteten hos epididymal sperma (eller ductus deferens-sperma) bör bedömas eller videofilmas omedelbart efter avlivningen. Sperman bör skördas på sådant sätt att skador minimeras. Utspädningen av sperman för motilitetsanalysen bör göras med användning av godtagbara metoder (4). Procentandelen progressivt motila spermier bestäms subjektivt eller objektivt. Om datorstödd motilitetsanalys används (5)(6)(7)(8)(9)(10) görs härledningen av den progressiva motiliteten på grundval av användardefinierade trösklar för genomsnittlig banhastighet och linearitetsindex. Om proverna videofilmas (11) eller om bilderna registreras på annat sätt vid obduktionen, kan den efterföljande analysen begränsas till P- och F1-handjuren i kontroll- och högdosgruppen. Undantag till detta är om behandlingsrelaterade verkningar kan observeras, i vilket fall även grupperna med lägre doser bör utvärderas. Om det inte förekommer video-eller digitalbildsregistrering måste alla prover i alla behandlingsgrupper analyseras vid obduktionen.

Ett spermaprov från epididymis (eller vas deferens) utvärderas morfologiskt. Spermierna (minst 200 per prov) bör undersökas i form av fixerade våta preparat (12) och klassificeras som normala eller abnormala. Exempel på morfologiska abnormaliteter hos spermier är fusion, isolerade huvuden och missformade huvuden eller svansar. Utvärderingen bör göras omedelbart efter avlivningen för den valda undergruppen av handjur från alla dosgrupper. Om det finns video- eller digitalregistreringar kan utvärderingen göras senare. Även cellproverna från smear-test kan, om de fixeras, avläsas senare. I sådana fall kan kontroll- och högdosgruppen analyseras först. Om inga behandlingsrelaterade verkningar (t.ex. på spermans morfologi) kan observeras behöver de övriga dosgrupperna inte analyseras. Om behandlingsrelaterade verkningar kan observeras i högdosgruppen bör även grupperna med lägre doser utvärderas.

Om någon av de ovan nämnda spermabedömningsparametrarna har undersökts tidigare som ett led i ett systematiskt toxicitetstest som varat minst 90 dagar, behöver bedömningen inte nödvändigtvis upprepas i tvågenerationstestet. Det rekommenderas dock att prover eller digitala registreringar av P-generationens sperma bevaras, så att en utvärdering vid behov kan göras senare.

1.5.5 **Avkomma**

Varje kull undersöks så snart som möjligt efter födseln (diperiodens dag 0) för att fastställa antalet ungar och deras kön, antalet dödfödda ungar, antalet levande ungar och förekomsten av betydande anomalier. Ungar som konstateras vara döda på dag 0 bör helst, om de är tillräckligt intakta, undersökas för eventuella defekter och dödsorsak, samt bevaras. De levande ungarna räknas och vägs individuellt efter födseln (diperiodens dag 0) eller på dag 1. Därefter vägs ungarna på de reguljära vägningsdagarna, t.ex. diperiodens dagar 4, 7, 14 och 21. Fysiska eller beteendemässiga abnormaliteter hos moderdjuren eller avkomman bör registreras.

▼B

Avkommans fysiska utveckling bör registreras, främst genom ökningen i kroppsvikt. Övriga fysiska parametrar (t.ex. öron- och ögonöppningar, tandsprickning, hårväxt) kan ge tilläggsinformation, men dessa data bör helst utvärderas i samband med data om sexuell mognad (t.ex. ålder och kroppsvikt när vagina öppnas eller när balano-preputial separation sker) (13). Funktionella undersökningar (t.ex. motorisk aktivitet, sensorisk funktion, reflex ontogeni) hos F1-avkomman före och/eller efter avvänjningen, särskilt faktorer som hör samman med den sexuella mognaden, rekommenderas om sådana undersökningar inte ingår i separata test. Åldern då vagina öppnas och preputial separation sker bör bestämmas för de avvanda F1-ungar som väljs ut för parning. Anogenitalt avstånd mäts på dag 0 efter födseln hos F2-ungar, om detta bedöms vara nödvändigt på grund av att F1-generationen har avvikelser rörande kvoten mellan könen eller tidpunkten för sexuell mognad.

De funktionella observationerna kan utelämnas för grupper som på annat sätt uppvisar tecken på skadliga verkningar (t.ex. betydande minskning av viktökningen). Om funktionella undersökningar görs, ska de inte omfatta de ungar som har valts ut för parning.

1.5.6 **Obduktion**

När testet avslutas eller om djur dör under testets gång, ska alla föräldradjur (P och F1), alla ungar med externa abnormaliteter eller kliniska tecken samt en slumpmässigt vald unge per kön och kull från både F1- och F2-generationen undersökas makroskopiskt för eventuella strukturella abnormaliteter eller patologiska avvikelser. Särskild uppmärksamhet bör fästas vid reproduktionssystemets organ. Döende ungar som avlivas humant eller döda ungar bör, förutsatt att de är tillräckligt intakta, undersökas för eventuella defekter och dödsorsak, samt bevaras.

Livmodern hos alla förstfödande hondjur ska undersökas på ett sätt som inte stör den histopatologiska utvärderingen, för förekomsten av implantationer och deras antal.

1.5.7 **Organvikter**

Vid testets slut bestäms kroppsvikten och vikten hos följande organ för alla P- och F1-föräldradjur (pariga organ vägs individuellt):

— Livmoder, äggstockar.

— Testiklar, bitestiklar (totalt och cauda).

— Prostata.

— Sädesblåsa med koaguleringskörtlar och deras vätskor samt prostatan (som en enhet).

— Hjärna, lever, njurar, mjälte, hypofys, sköldkörtel och adrenalinkörtel samt kända målorgan.

Kroppsvikten vid testets slut bestäms för de F1- och F2-ungar som väljs ut för obduktion. Vikten bestäms även för följande organ från den slumpmässigt valda ungen per kön per kull (se avsnitt 1.5.6): hjärna, mjälte och bisköldkörtel.

▼B

Resultaten från obduktionen och vägningen av organ bör i tillämplig mån bedömas med hänsyn till observationer från andra test med upprepad dos.

1.5.8 **Histopatologi**

1.5.8.1 *Föräldradjur*

Följande organ och vävnader (eller representativa prover) från föräldradjuren (P och F1) ska fixeras och förvaras i ett lämpligt medium för histopatologisk undersökning:

— Vagina, livmoder med livmoderhals samt äggstockar (bevarade i adekvat fixervätska).

— En testikel (bevarad i Bouins fixervätska eller motsvarande), en bitestikel, sädesblåsa, prostata och koaguleringskörtel.

— Tidigare identifierade målorgan från alla P- och F1-djur som har valts ut för parning.

Fullständig histopatologi görs av de ovan uppräknade bevarade organen och vävnaderna för alla sådana P-och F1-djur i högdos- och kontrollgruppen som har valts ut för parning. Undersökning av äggstockarna hos P-djuren är inte obligatorisk. Organ som har behandlingsrelaterade avvikelser bör även undersökas i låg- och medeldosgrupperna som stöd för bestämningen av NOAEL. Dessutom bör histopatologisk undersökning göras på reproduktionsorganen från sådana djur i låg- och medeldosgruppen som misstänks för reducerad fertilitet, t.ex. djur som inte parade sig, inte befruktades, inte avlade, eller djur som inte födde frisk avkomma. Alla betydande skador såsom atrofi eller tumörer bör undersökas.

Detaljerad histopatologisk undersökning görs på testiklarna (t.ex. med användning av Bouins fixervätska, paraffininbäddning och transverssektioner av 4–5 μm tjocklek) för att identifiera behandlingsrelaterade verkningar såsom tillbakabildade spermatider, uteblivna germinalcellslager eller -typer, multinukleära jätteceller eller degraderingen av spermatogeniska celler in i lumen (14). Undersökning av den intakta bitesti-keln ska inbegripa caput, corpus och cauda, vilket kan åtföljas av en utvärdering av en longitudinell sektion. Bitestikeln utvärderas för leukocytinfiltration, förändringar i prevalensen av celltyper, avvikande celltyper och spermafagocytos. PAS och hematoxylinfärgning kan användas för undersökning av handjurens reproduktionsorgan.

Äggstockarna efter diperioden bör innehålla primordiala och växande folliklar samt de stora corpora lutea från diperioden. Den histopatologiska undersökningen bör detektera kvalitativ utarmning av den primordiala follikelpopulationen. En kvantitativ utvärdering av de primordiala folliklarna görs för F1-hondjuren. Antalet djur, valet av äggstockssektion och sektionens storlek bör vara statistiskt lämpliga för det utvärderingsförfarande som används. Utvärderingen bör inbegripa räkning av antalet primordiala folliklar, som kan kombineras med små växande folliklar, för jämförelse av äggstockarna hos behandlinggruppernas och kontrollgruppens djur (15)(16)(17)(18)(19).

▼B

1.5.8.2 *Avvanda ungar*

Grovt abnormala vävnader och målorgan från alla ungar med externa abnormaliteter eller kliniska tecken, samt från en slumpmässigt vald unge per kön och per kull i både F1- och F2-generationen (som inte valts ut för parning), ska fixeras och förvaras i ett lämpligt medium för histopatologisk undersökning. Fullständig histopatologisk karakterisering av bevarade vävnader bör göras, med särskild tonvikt på reproduktionssystemets organ.

2. **DATA**

2.1 BEHANDLING AV RESULTATEN

Data rapporteras individuellt för moderdjuren och deras avkomma och sammanställs i en tabell. Tabellen ska för varje testgrupp och varje generation visa antalet djur vid testets början, antalet djur som under testets gång har dött eller avlivats av humana skäl, tidpunkten för alla dödsfall eller humana avlivningar, antalet fertila djur, antalet dräktiga hondjur, antalet djur som uppvisar tecken på toxicitet, en beskrivning av de toxicitetstecken som har observerats (tidpunkten då sådana först upptäcktes, de toxiska verkningarnas varaktighet och allvarlighetsgrad), typerna av observationer om föräldradjur och avkomma, typerna av histopatologiska avvikelser och alla relevanta data om kullarna.

De numeriska resultaten ska utvärderas med en lämplig och allmänt erkänd statistisk metod. Valet av statistiska metoder bör ingå som en del av testets utformning och bör motiveras. Statistiska dosresponsmodeller kan vara användbara för analysen av data. Rapporten ska innehålla tillräckligt med information om analysmetoden och det datorprogram som används, så att en oberoende granskare eller statistiker kan göra en ny utvärdering och rekonstruera analysen.

2.2 UTVÄRDERING AV RESULTATEN

Resultaten från detta test för reproduktionstoxicitet på två generationer ska utvärderas med avseende på de observerade verkningarna, inbegripet resultaten från obduktion och mikroskopiska undersökningar. Utvärderingen ska omfatta förhållandet mellan, eller avsaknaden därav, mellan testämnesdosen och närvaron eller frånvaron, incidensen och allvarlighetsgraden för abnormaliteter, inbegripet grova skador, identifierade målorgan, verkningar på fertiliteten, kliniska abnormaliteter, verkningar på reproduktionsförmågan och kullen, avvikelser rörande kroppsvikt, verkningar på mortaliteten samt alla andra toxiska verkningar. Vid utvärdering av testresultaten bör hänsyn tas till testämnets fysikalisk-kemiska egenskaper och de toxikokinetiska data som är kända.

Ett korrekt genomfört test för reproduktionstoxicitet bör inbegripa en tillfredsställande uppskattning av den nivå där inga verkningar observeras och ge en förståelse för de skadliga verkningarna på reproduktion, födsel och digivning, samt på den postnatala utvecklingen inklusive tillväxt och sexuell utveckling.

▼B

2.3 TOLKNING AV RESULTATEN

Ett test för reproduktionstoxicitet på två generationer ska ge information om verkningarna av upprepad exponering för ett ämne under alla faser av reproduktionscykeln. Testet ska särskilt ge information om reproduktionsparametrarna samt om avkommans utveckling, tillväxt, mognad och överlevnad. Testresultaten ska tolkas tillsammans med resultaten från test avseende subkronisk toxicitet, prenatal utvecklingstoxicitet och toxikokinetik samt andra kända testresultat. Resultaten från detta test kan användas för att bedöma behovet av ytterligare testning av en kemikalie. Extrapolering av testresultaten till att gälla för exponering på människor kan i viss utsträckning godtas. Resultaten kan bäst tillämpas på information om dosnivåer där inga verkningar kan observeras och information om tillåten exponering på människor (20)(21)(22)(23).

3. **RAPPORTERING**

3.1 TESTRAPPORT

Testrapporten ska innehålla nedan angivna uppgifter.

Testämne:

— Fysikalisk natur och, när det är relevant, fysikalisk-kemiska egenskaper.

— Identifieringsdata.

— Renhetsgrad.

Vehikel (i förekommande fall).

— Motivering för val av vehikel, om annan än vatten.

Testdjur:

— Art och stam som använts.

— Djurens antal, ålder och kön.

— Ursprung, förvaringsbetingelser, foder och dylikt.

— Djurens individuella vikt vid testets början.

Testbetingelser:

— Motivering för val av dosnivåer.

— Uppgifter om testämnets sammansättning och beredning av fodret, uppnådda halter.

— Blandningens stabilitet och homogenitet.

— Utförliga uppgifter om hur testämnet har tillförts.

— Omräkning av testämneskoncentrationen i foder eller vatten (ppm) till faktisk dos (mg per kg kroppsvikt och dag), om tillämpligt.

— Uppgifter om foder- och vattenkvalitet.

▼B

Resultat:

— Foderkonsumtion och, i mån av tillgänglighet, vattenkonsumtion, fodereffektivitet (kroppsviktsökning per gram konsumerat foder) och testämneskonsumtionen för P- och F1-djuren, utom för perioden för sammanlevnad och för minst den sista tredjedelen av diperioden.

— Absorptionsdata, om sådana är kända.

— Uppgifter om kroppsvikt för de P- och F1-djur som har valts ut för parning.

— Kullens och ungarnas vikt.

— Kroppsvikt vid avlivningen samt absolut och relativ organvikt för föräldradjuren.

— Art, grad och varaktighet för kliniska observationer (om de är reversibla eller inte).

— Tidpunkten (dag) för dödsfall under testets gång och huruvida djuren överlevde till testets slut.

— Uppgifter om toxisk respons per kön och dos, inbegripet index för parning, fertilitet, dräktighet, födsel, livsduglighet och digivning. Rapporten bör även innehålla de sifferuppgifter som har använts för beräkningen av dessa index.

— Toxiska eller andra verkningar på reproduktion, avkomma, postnatal tillväxt och dylikt.

— Obduktionsfynd.

— En detaljerad beskrivning av alla histopatologiska fynd.

— Antalet P- och F1-hondjur med normal cykel och cykelns längd.

— Totalantalet spermier från cauda epididymis, procentandelen progressivt motila spermier, procen tandelen morfologiskt normala spermier och procentandelen spermier per varje identifierad abnormalitet.

— Tid till parning, inbegripet antalet dagar fram till dess att parning skett.

— Dräktighetsperiodens längd.

— Antalet implantationer, antalet corpora lutea och kullstorlek.

— Antalet levande födda och antalet förluster efter implantation.

— Antalet ungar med grova synliga abnormaliteter och, eventuellt, antalet onormalt små individer.

— Fysiska kännetecken hos ungarna och andra uppgifter om den postnatala utvecklingen. Motivering bör ges för valet av vilka kännetecken som utvärderas.

— Funktionsobservationer hos ungar och vuxna, om tillämpligt.

— Statistisk bearbetning av resultaten, i tillämpliga fall.

▼B

Diskussion om resultaten.

Slutsatser, inbegripet värden för den lägsta nivå där inga verkningar kan observeras (NOAEL) hos moderdjur och avkomma.

4. **HÄNVISNINGAR**

1. Sadleir, R.M.F.S. (1979), ”Cycles and Seasons”, *Reproduction in Mammals,* I. Germ Cells and Fertilization, C.R. Auston och R.V. Short (red.), 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 and Fertility,* 54:103–107.

4. Klinefelter, 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: Methodologic Considerations”, *Reproductive Toxicology,* 5:449–458.

9. Slott, V.L. och Perreault, S.D. (1993), ”Computer-Assisted Sperm Analysis of Rodent Epididymal Sperm Motility Using the Hamilton-Thorn Motility Analyzer”, *Methods in Toxicology, Part A.,* Academic, Orlando, Florida, 319–333.

10. Toth, G.P. et al. (1989), ”The Automated Analysis of Rat Sperm Motility Following Subchronic Epichlorhydrin Administration: Methodologic and Statistical Considerations”, *Journal of Andrology,* 10:401–415.

11. Working, P.K. och M. Hurtt (1987), ”Computerized Videomicrographic 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,* 17:298–303.

14. Russell, L.D. et al. (1990), ”Histological and Histopathological Evaluation of the Testis”, Cache River Press, Clearwater, Florida.

15. Heindel, J.J. och R.E. Chapin, (red.) (1993), ”Part B. Female Reproductive Systems, Methods in Toxico logy”, Academic, Orlando, Florida.

16. Heindel, J.J. et al. (1989), ”Histological Assessment of Ovarian Follicle Number in Mice As a Screen of Ovarian Toxicity, Growth Factors and the Ovary”, A.N. Hirshfield (red.), Plenum, New York, 421–426.

17. Manson, J.M. och Y.J. Kang, (1989), ”Test Methods for Assessing Female Reproductive and Developmental Toxicology”, *Principles and Methods of Toxicology,* A.W. Hayes (red.), 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 och C.A. Kimmel, (red.), ILSI Press, Washington, DC.

20. Thomas, J. A. (1991), ”Toxic Responses of the Reproductive System”, *Casarett and Doull's Toxicology,* M.O. Amdur, J. Doull och C.D. Klaassen (red.), Pergamon, New York.

21. Zenick, H. och E.D. Clegg (1989), ”Assessment of Male Reproductive Toxicity: A Risk Assessment Approach”, *Principles and Methods of Toxicology,* A.W. Hayes (red.), Raven Press, New York.

22. Palmer, A.K. (1981), *Developmental Toxicology,* Kimmel, C.A. och J. Buelke-Sam (red.), Raven Press, New York.

23. Palmer, A.K. (1978), *Handbook of Teratology,* Vol. 4, J.G. Wilson och F.C Fraser (red.), Plenum Press, New York.

▼M4

B.36 **TOXIKOKINETIK**

INLEDNING

1. Den här testmetoden motsvarar OECD:s TG 417 (2010). Studier som undersöker toxikokinetik (TK) i en testkemikalie utförs för att erhålla relevant information om dess absorption, distribution, biotransformering (dvs. metabolism) och exkretion, som hjälp för att relatera koncentration eller dos till den observerade toxiciteten, och för att underlätta förståelsen av dess toxicitetsmekanism. TK kan hjälpa till med att förstå de toxikologiska studierna genom att visa att försöksdjuren systematiskt exponeras för testkemikalien och genom att visa vilka som är de cirkulerande delarna (ursprunglig kemikal/metaboliter). Grundläggande TK-parametrar som bestämts genom dessa studier ger också information om risken för ackumulering av testkemikalien i vävnader och/eller organ och potentialen för framkallande av biotransformering som en följd av exponeringen av testkemikalien.

2. TK-data kan bidra till bedömningen av lämpligheten och relevansen av djurtoxicitetsdata för extrapolering av fara för människor och/eller riskbedömning. Dessutom kan toxikokinetiska studier ge användbar information för bestämning av dosnivåer för toxicitetsstudier (linjär kontra icke-linjär kinetik), administreringssättsverkningar, biotillgänglighet och frågor som rör studieutformning. Vissa typer av TK-data kan användas i fysiologiskt baserad toxikokinetisk (PBTK) modellutveckling.

3. Det finns viktiga användningsområden för metabolit/TK-data såsom föreslagen möjlig toxicitet och verkningssätt och deras relation till dosnivå och exponeringssätt. Dessutom kan metabolismdata ge användbar information för bedömning av den toxikologiska betydelsen av exponeringar till exogent frambringade metaboliter av testkemikalien.

4. Adekvat toxikokinetisk data är till hjälp för att stödja den fortsatta acceptansen och tillämpligheten av kvantitativa struktur-aktivitetssamband, jämförelse med strukturlika ämnen eller grupperingsstrategier i säkerhetsbedömningen av kemikalier. Kinetiska data kan också användas för att utvärdera den toxikologiska relevansen av andra studier (t.ex. in vivo/in vitro).

5. Om inget annat administreringssätt nämns (se särskilt punkterna 74–78) tillämpas denna testmetod på oral tillförsel av testkemikalien.

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN

6. Regelsystem har olika krav och behov vad gäller mätning av endpoints och parametrar relaterade till toxikokinetik för olika klasser av kemikalier (t.ex. bekämpningsmedel, biocider, industrikemikalier). Till skillnad från de flesta testmetoder beskriver denna testmetod toxikokinetisk testning, vilket omfattar ett flertal mätningar och endpoints. I framtiden kan flera nya testmetoder och/eller vägledningsdokument utvecklas för att beskriva varje endpoint enskilt och mer detaljerat. När det gäller denna testmetod, vars tester eller bedömningar specificeras av kraven och/eller behoven för varje regelsystem.

▼M4

7. Det finns många studier som kan utföras för att utvärdera TK-beteendet hos en testkemikalie för regulatoriska ändamål. Dock är, beroende på särskilda regulatoriska behov eller situationer, inte alla dessa möjliga studier nödvändiga för utvärderingen av en testkemikalie. Flexibilitet, med hänsyn till den undersökta testkemikaliens egenskaper, behövs vid utformningen av toxikokinetiska studier. I några fall kanske bara vissa frågor behöver utforskas för att ta itu med de testkemikalierelaterade faro- och riskfrågorna. I några sammanhang kan TK-data samlas som en del av utvärderingen i andra toxikologiska studier. I andra sammanhang kan ytterligare och/eller mer omfattande TK-studier vara nödvändiga beroende på behovet av regler och/eller om nya frågor uppstår som en del av testkemikaliens utvärdering.

8. All tillgänglig information om testkemikalien och relevanta metaboliter och analoger bör beaktas av laboratoriet innan studien genomförs i syfte att höja studiekvaliteten och undvika onödig djuranvändning. Detta kan omfatta data från andra relevanta testmetoder (in vivo-studier, in vitro-studier, och/eller in silico-utvärderingar). Fysikalisk-kemiska egenskaper, såsom en kemikalies fördelningskoefficient i oktanol-vatten (uttryckt som log P_{OW}), pKa, vattenlöslighet, ångtryck och molekylvikt kan vara användbara för planering av en studie och tolkning av resultat. De kan fastställas med lämpliga metoder som beskrivs i de relevanta testmetoderna.

BEGRÄNSNINGAR

9. Denna testmetod är inte utformad för att hantera särskilda omständigheter, såsom dräktigt eller diande djur och avkomma, eller för att utvärdera potentiella resthalter i exponerade livsmedelproducerande djur. Däremot kan datan som erhålls från en B.36-studie ge bakgrundsinformation som en vägledning vid utformning av specifika studier för dessa undersökningar. Den här testmetoden är inte avsedd för testning av nanomaterial. En rapport om preliminär översyn av OECD:s testriktlinjer för deras tillämplighet för nanomaterial visar att TG 417 (motsvarande denna testmetod B.36) inte kan tillämpas på nanomaterial (1).

DEFINITIONER

10. Definitioner som används för tillämpningen av denna testmetod finns i tillägget.

DJURSKYDDSÖVERVÄGANDEN

11. Vägledning om human behandling av djur finns i OECD:s vägledningsdokument (GD) 19 (2). Det rekommenderas att OECD:s GD 19 konsulteras för alla in vivo- och in vitro-studier beskrivna i denna testmetod.

BESKRIVNING AV METODER

Pilotstudier

12. Användning av pilotstudier rekommenderas och uppmuntras vid valet av försöksparametrar till toxikokinetiska studier (t.ex. metabolism, massbalans, analysförfaranden, dosfinnande, utandning av CO_2, etc.). Karakteriseringen av vissa av dessa parametrar kräver inte användningen av radioaktivt märkta kemikalier.

▼M4

Val av djur

Arter

13. De djurarter (och den stam) som används för TK-testning bör helst vara densamma som användes i andra toxikologiska studier utförda med testkemikalien av intresse. Normalt bör råtta användas då den har använts i stor utsträckning för toxikologiska studier. Användningen av andra eller ytterligare arter kan vara befogat om viktiga toxikologiska studier visar prov på signifikant toxicitet i dessa arter eller om deras toxicitet/toxikokinetik visar sig vara mer relevant för människor. Motivering bör ges för val av djurart och dess stam.

14. Om inte annat anges avser denna testmetod råttan som försöksart. Vissa aspekter för metoden kan behöva modifieras vid användningen av andra försöksarter.

Ålder och stam

15. Unga friska vuxna djur (normalt 6–12 veckor vid tidpunkten för doseringen) bör användas (se också punkterna 13 och 14). Motivering bör ges för användningen av djur som inte är unga vuxna. Alla djur bör vara i samma ålder i början av studien. Viktskillnaden mellan enskilda djur bör inte överstiga ± 20 % av medelvikten för testgruppen. Helst bör den stam som används vara samma som användes för härledning av den toxikologiska databasen för testkemikalien.

Djurens antal och kön

16. Minst fyra djur av samma kön bör användas för varje dos som testas. Motivering bör ges för könet på de djur som används. Användningen av båda könen (fyra hanar och fyra honor) bör övervägas om det finns belägg för betydande könsrelaterade skillnader i toxicitet.

Inhysnings- och utfodringsförhållanden

17. Djuren bör i regel inhysas individuellt under testperioden. Inhysning i grupp kan vara berättigad under särskilda omständigheter. Belysningen bör vara artificiell med omväxlande 12 timmra ljus och 12 timmar mörker. Temperaturen i försöksdjurens utrymmen bör vara 22 °C (± 3 °C) och den relativa fuktigheten 30–70 %. För utfodringen kan konventionellt laboratoriefoder användas med ett obegränsat utbud av dricksvatten.

Testkemikalie

18. En radioaktivt märkt testkemikalie med ^{14}C kan användas för alla massbalans- och metabolitidentifieringsaspekter av studien, men om det kan påvisas att:

— Massbalans och metabolitidentifiering kan utvärderas tillräckligt med den omärkta testkemikalien.

— Den analytiska specificiteten och sensitiviteten för metoden som används med en icke-radioaktiv testkemikalie är lika med eller större än det som kan uppnås med den radioaktivt märkta testkemikalien.

▼M4

Då behöver man inte använda en radioaktivt märkt testkemikalie. Vidare kan andra radioaktiva och stabila isotoper användas, särskilt om ämnet svarar för eller är en del av testkemikaliens toxiska del. Om möjligt bör den radioaktiva märkningen lokaliseras i en kärndel av molekylen som är metaboliskt stabil (den är inte utbytbar, avlägsnas inte metaboliskt som CO_2 och blir inte del av en-kolreserven i organismen). Märkning av flera platser eller specifika områden i molekylen kan vara nödvändig för att se vad som händer med testkemikaliens metabolism.

19. De radioaktivt märkta och omärkta testkemikalierna bör analyseras med lämpliga metoder för att upprätta renhet och identitet. Den radioaktiva renheten hos den radioaktiva testkemikalien bör vara den högst uppnåbara för en viss testkemikalie (helst mer än 95 %) och rimlig ansträngning bör göras för att identifiera föroreningar som förekommer i 2 % eller mer. Renheten tillsammans med identiteten och andelen eventuella orenheter som har identifierats bör rapporteras. Enskilda reglerande program kan välja att ge ytterligare vägledning som hjälp för definitionen och specifikationerna av testkemikalier som består av blandningar för bestämning av renhet.

Val av dos

Pilotstudie

20. Vanligtvis är en enkel oral dos tillräcklig för pilotstudien. Dosen bör vara icke-toxisk, men tillräckligt hög för att medge metabolisk identifiering i exkret (och plasma om tillämpligt) samt uppfylla det fastställda syftet med pilotstudien som nämns i punkt 12 i denna testmetod.

Huvudstudier

21. För huvudstudierna är minst två doser att föredra eftersom samlad information från minst två dosgrupper kan vara behjälplig för dosinställning i andra toxicitetsstudier, och hjälpa till med dosrespons-bedömningen av redan tillgängliga toxicitetstester.

22. Om två doser administreras bör båda doserna vara tillräckligt höga för att medge metabolisk identifiering i exkrement (och plasma om tillämpligt). Information från tillgängliga toxicitetsdata bör beaktas vid valet av dos. Om informationen inte är tillgänglig (t.ex. från akuta orala toxicitetsstudier med registrerade tecken på toxicitet eller från toxicitetsstudier med upprepad dosering) kan ett värde för den högre dosen som ligger under LD_{50}- (oralt och via huden) eller LC_{50}-uppskattningen (inhalation), eller under det lägre värdet för akut toxicitetsintervall beaktas. Den lägre dosen bör vara en del av den högre dosen.

23. Om endast en dosnivå undersöks bör helst dosen vara tillräckligt hög för att medge metabolitidentifiering i exkrement (och plasma om tillämpligt), utan att framkalla uppenbar toxicitet. En motivering bör ges till varför inte en andra dosnivå har inkluderats.

24. Om doseffekten på de kinetiska processerna behöver upprättas kanske två doser inte räcker och minst en dos behöver vara tillräckligt hög för att mätta dessa processer. Om arean under plasmakoncentration-tidkurvan (AYC) inte är linjär mellan två dosnivåer som används i huvudstudien, är detta ett tydligt tecken på att mättnad av en eller flera kinetiska processer sker någonstans mellan de två dosnivåerna.

▼M4

25. För testkemikalier med låg toxicitet bör en maximal dos på 1 000 mg/kg kroppsvikt (oralt och via huden) användas (om administreringen sker via inhalation, se kapitel B.2 i denna bilaga för vägledning; vanligtvis överskrider inte denna dos 2 mg/l). Kemisk-specifika överväganden kan kräva en högre dos beroende på regleringsbehoven. Valet av dos ska alltid motiveras.

26. Engångsdostoxikokinetiska data och vävnadsdistributionsdata kan vara lämpliga för att fastställa potentialen för ackumulering och/eller persistens. I vissa fall kan dock administrering med upprepad dos behövas i) för att mer fullständigt hantera potentialen för ackumulering och/eller persistens eller förändringar i TK (t.ex. enzyminduktion och inhibition), eller ii) vad som krävs enligt tillämpliga regelsystem. I studier med upprepad dosering där administrering med upprepade låga doser vanligtvis räcker, kan under vissa omständigheter också vara nödvändiga (se även punkt 57).

Administrering av testkemikalie

27. Testkemikalien ska upplösas eller suspenderas homogent i samma vehikel som används i andra toxicitetsstudier med oral sondmatning som utförs med testkemikalien, om sådan vehikelinformation finns tillgänglig. Grunden för valet av vehikel ska ges. Valet av vehikel och doseringsvolymen ska beaktas vid studiens utformning. Det sedvanliga administreringssättet är genom sondmatning, dock kan administrering via gelatinkapsel eller foderblandning vara fördelaktig i specifika situationer (i båda fallen bör detta motiveras). Verifiering av den faktiska dos som administreras till varje djur bör ges.

28. Den maximala volymen vätska som ska administreras genom sondmatning vid ett tillfälle beror på försöksdjurens storlek, typen av dosvehikel, och huruvida fodret undanhålls eller ej före administreringen av testkemikalien. Motivering för administrering eller undanhållande av foder före dosering ska ges. I regel bör volymen hållas så låg som möjligt för antingen vattenbaserade eller icke-vattenbaserade vehiklar. Dosvolymer bör normalt inte överskrida 10 ml/kg kroppsvikt för gnagare. Vehikelvolymer som används för mer lipofila testkemikalier kan börja med 4 ml/kg kroppsvikt. Vid upprepad dosering, när dagligt fastandet kontraindiceras, bör lägre dosnivåer (t.ex. 2–4 ml/kg kroppsvikt) övervägas. Där så är möjligt kan man överväga att använda en dosvolym som överensstämmer med den som administrerats i andra sondmatningsstudier av en testkemikale.

29. Intravenös (IV) administrering av testkemikalien och mätning av testkemikalien i blod och/eller exkrement kan användas för att fastställa biotillgänglighet eller relativ oral absorption. För IV-studien administreras en engångsdos (vanligtvis lika med men inte överskridande den lägre orala dosen – se val av dos) av testkemikalien med en lämplig vehikel. Detta ämne bör administreras i lämplig volym (t.ex. 1 ml/kg kroppsvikt) på den valda platsen för administreringen till minst fyra djur av lämpligt kön (båda könen kan användas om det är befogat, se punkt 16). En fullt upplöst eller suspenderad dosberedning är nödvändig för IV-administrering av testkemikalien. Vehikeln för IV-administrering ska inte störa blodintegriteten eller blodflödet. Om testkemikalien infunderas bör infusionshastigheten rapporteras och standardiseras mellan djuren, förutsatt att en infusionspump

▼M4

används. Narkos bör användas om man för in en kanyl i halsvenen (för administrering av testkemikalie och/eller insamling av blod) eller om man använder den femorala artären för administreringen. Hänsyn bör tas till den typ av bedövning som kan påverka toxikokinetiken. Djuren bör få tillfälle att återhämta sig före administreringen av testkemikalien plus vehikeln.

30. Andra administreringssätt, såsom hud och inhalation (se punkterna 74–78), kan vara tillämpliga för vissa testkemikalier med tanke på deras fysikaliskkemiska egenskaper och den förväntade mänskliga användningen eller exponeringen.

Mätningar

Massbalans

31. Massbalans bestäms genom summering av procenten för den administrerade (radioaktiva) dosen som utsöndrats i urin, avföring och utandningsluft, och procentandelen som finns i vävnader, resterna av kroppen och burtvätt (se punkt 46). Generellt anses en total återvinning av den administrerade testkemikalien (radioaktivitet) i storleksordningen > 90 % vara tillräcklig.

Absorption

32. En initial uppskattning av absorption kan uppnås genom att utesluta den procentuella dosen i det gastrointestinala (GI) området och/eller avföringen från massbalansbestämningen. För procentberäkningen av absorption, se punkt 33. För undersökning av avföring, se punkterna 44–49. Om den exakta omfattningen av absorption efter oral dosering inte kan fastställas genom massbalansstudier (t.ex. där mer än 20 % av den administrerade dosen finns i avföringen) kan ytterligare undersökningar vara nödvändiga. Dessa studier kan antingen omfatta 1) oral administrering av testkemikalie och mätning av testkemikalie i galla eller 2) oral och intravenös administrering av testkemikalien och mätning av nettotestkemikalie i urin plus utandningsluft plus kadaver för var och en av de båda sätten. I båda studieutformningarna genomförs mätning av radioaktivitet som en surrogatmetod för kemikaliespecifik analys av testkemikalien plus metaboliter.

33. Om en gallutsöndringsstudie genomförs används vanligtvis oral administrering. I denna studie bör kanyler föras in i gallgångarna hos minst fyra djur av lämpligt kön (eller av båda könen om det är befogat) och en engångsdos av testkemikalien ska administreras. Efter administreringen av testkemikalien bör utsöndringen av radioaktivitet/testkemikalie i gallan övervakas så länge som krävs för att uppskatta procentandelen av den administrerade dosen som utsöndras via denna väg, som kan användas för att direkt beräkna omfattningen av oral absorption enligt följande:

$$\text{Procentandel absorption} = \frac{(\text{mängd i galla} + \text{urin} + \text{utandningsluft} + \text{kropp utan matspjälkningskanalinnehåll})}{\text{administrerad mängd}} \times 100$$

34. I några klasser av testkemikalien kan direkt utsöndring av den absorberade dosen uppträda i de intestinala membranen. I sådana fall anses inte mätningen av %-dosen i avföringen efter en oral dos i gallgången representativt för den icke-absorberade dosen. Det rekommenderas att då tarmsekretion tros ske baseras den absorberade %-dosen på absorptionen beräknad på utsöndringen efter den orala jämfört med den intravenösa (hel eller gallgång) (se punkt 35). Det rekommenderas också att om kvantifiering av tarmsekretet anses nödvändig, mäts exkretionen i gallgången efter den intravenösa administreringen.

▼M4

Biotillgänglighet

35. Biotillgänglighet kan bestämmas genom plasma-/blodkinetik på de orala och intravenösa grupperna, såsom beskrivs i punkterna 50–52, genom särskilda kemiska analyser av testkemikalien och/eller relevant metabolit(er), därför krävs inte testkemikalier märkta med radioaktivitet. Beräkningen av testkemikaliens biotillgänglighet (F) eller relevant metabolit(er) kan utföras enligt följande:

$$F = (AUC_{exp}/AUC_{IV}) \times (Dos_{IV}/Dos_{exp})$$

Där AUC är arean under plasmakoncentration-tidkurvan, och exp är den experimentella vägen (oral, dermal eller via inhalation).

36. Vid riskbedömning av systematiska effekter, föredras i allmänhet biotillgänglighet framför procentuell absorption när man jämför systematiska koncentrationer i djurstudier med analoga bioövervakningsdata från studier över arbetstagares exponering. Situationen kan bli mer komplicerad om doserna är i det icke-linjära området så det är viktigt att toxikokinetisk screening bestämmer doserna i det linjära området.

Vävnadsfördelning

37. Kunskap om en testkemikalies vävnadsfördelning och/eller dess metaboliter är viktig för identifieringen av målvävnader och förståelsen för de underliggande mekanismerna för toxicitet, samt information om testkemikaliens potential och metabolitackumulering och persistens. Procentandelen av den totala (radioaktiva) dosen i vävnader samt rester i kroppen är det som minst som ska mätas vid exkretionsförsökets upphörande (t.ex. upp till 7 dagar efter dosering eller mindre beroende på testkemikaliens specifika beteende). När ingen testkemikalie detekteras i vävnaderna vid studiens upphörande (t.ex. för att testkemikalien kanske har eliminerats före studiens upphörande på grund av en kort halveringstid), bör man vara försiktig för att undvika feltolkning av datan. I denna typ av situation bör vävnadsfördelningen undersökas vid tidpunkten för testkemikaliens (och/eller metabolit) plasma-/blodtoppkoncentration (T_{max}) eller topphastighet för urinexkretion, när så är lämpligt (se punkt 38). Vidare kan vävnadsinsamlingar vid ytterligare tidpunkter vara nödvändiga för att bestämma vävnadsfördelningen av testkemikalien och/eller dess metaboliter, bedöma tidsberoendet (om tillämpligt), underlätta upprättande av massbalansen och/eller det som krävs av en behörig myndighet. Vävnader som bör samlas in är lever, fett, magtarmkanalen, njurar, mjälte, helblod, rester av kroppen, målvävnadsorgan och eventuellt andra vävnader (t.ex. sköldkörtel, erytrocyter, reproduktionsorgan, hud, öga (särskilt i pigmenterade djur) som har en potentiell betydelse för den toxikologiska utvärderingen av testkemikalien. Analys av ytterligare vävnader vid samma tidpunkter bör beaktas för att maximera utnyttjandet av djuren och i händelse av att målorgantoxicitet observeras i subkroniska eller kroniska toxicitetsstudier. Den (radioaktiva) restkoncentrationen och förhållandet vävnad-blod bör också rapporteras.

38. Utvärderingen av vävnadsfördelningen vid ytterligare tidpunkter såsom tidpunkten för plasma-/blodtoppkoncentrationen (t.ex. T_{max}) eller urinexkretionens topphastighet, kan också behövas eller krävas av en behörig myndighet. Denna information kan underlätta förståelsen av toxicitet samt testkemikaliens potential och metabolitackumulering och persistens. Motivering för urvalet bör ges; prover för analys bör i allmänhet vara desamma som de ovan (se punkt 37).

▼M4

39. Kvantifiering av radioaktivitet i vävnadsfördelningsstudier kan utföras med organdissektion, homogenisering, förbränning och/eller löslighet, följt av vätskescintillationsräkning (LSC) av fångade rester. Vissa tekniker, för närvarande på olika utvecklingsstadier t.ex. kvantitativ helkroppsautoradiografi och receptormikroskopisk autoradiografi, kan vara användbara för att bestämma fördelningen av en testkemikalie i organ och/eller vävnader (3) (4).

40. För exponeringsvägar annat än orala, bör specifika vävnader samlas in och analyseras, såsom lungor i inhalationsstudier och hud i dermala studier. Se punkterna 74–78.

Metabolism

41. Exkret (och plasma, i förekommande fall) bör samlas in för identifiering och kvantifiering av oförändrad testkemikalie och metaboliter som beskrivs i punkterna 44–49. Det är acceptabelt med sammanslagning av urin och avföring för att underlätta metabolitidentifiering inom en given dosgrupp. Profilering av metaboliter från varje tidsperiod rekommenderas. Om bristen på prov och/eller radioaktivitet utesluter detta, är det dock acceptabelt med sammanslagning av urin och avföring över flera tidpunkter, men sammanslagning mellan könen eller doser är inte acceptabelt. Lämpliga kvalitativa och kvantitativa metoder ska användas för att analysera urin, avföring, sönderfallen radioaktivitet från behandlade djur samt galla vid behov.

42. Rimliga ansträngningar bör göras för att identifiera alla metaboliter som finns i 5 % eller mer av den administrerade dosen och för att tillhanda ett metaboliskt system för testkemikalien. Testkemikalier som kännetecknas av exkrementer som innefattar 5 % eller mer av den administrerade dosen bör identifieras. Identifiering hänvisar till den exakta strukturella bestämningen av komponenter. Normalt utförs identifiering antingen genom co-kromatografi av metaboliten med kända standarder som använder två olika system eller tekniker för positiv strukturell identifiering, såsom masspektrometri, kärnmagnetisk resonans (NMR) etc. När det gäller co-kromatografi anses inte kromatografiska tekniker som använder samma stationära fas med två olika lösningsmedelsystem vara en lämplig tvåmetodsverifiering av metabolitidentitet, eftersom metoderna inte är självständiga. Identifiering genom co-kromatografi ska erhållas genom användning av två olika analytiskt oberoende system såsom omvänd och normal tunnskiktskromatografi (TLC) och vätskekromatografi (HPLC). Förutsatt att den kromatografiska separationen är av lämplig kvalitet är ytterligare bekräftelse genom spektroskopi inte nödvändig. Alternativt kan otvetydig identifiering även erhållas med metoder som ger strukturell information såsom vätskekromatografi/masspektrometri (LC-MS) eller vätskekromatografi/tandem-masspektrometri (LC-MS/MS), gaskromatografi/masspektrometri (GC-MS), och NMR-spektrometri.

43. Om det inte är möjligt med identifiering av metaboliter på 5 % eller mer av den administrerade dosen bör en motivering/förklaring lämnas i slutrapporten. Det kan vara lämpligt att identifiera metaboliter som utgör mindre än 5 % av den administrerade dosen för att få en bättre förståelse av metabolismen för faro- och/eller riskbedömning av testkemikalien. Strukturell bekräftelse ska lämnas när det är möjligt. Detta kan inkludera profilering av plasma eller blod, eller andra vävnader.

▼M4

Exkretion

44. Hastigheten och omfattningen av exkretion av den administrerade dosen bör bestämmas genom mätning av procentandelen av den återvunna (radioaktiva) dosen från urin, avföring och utandningsluft. Dessa data hjälper också till att etablera massbalans. De kvantiteter av testkemikalien (radioaktivitet) som eliminerats i urin, avföring och utandningsluft bör bestämmas med lämpliga tidsintervall (se punkterna 47–49). Försök med upprepad dos ska utformas för att medge insamling av exkretionsdata för att uppfylla de mål som beskrivs i punkt 26. Detta kommer att möjliggöra jämförelse med försök med engångsdos.

45. Om en pilotstudie har visat att ingen signifikant mängd av testkemikalien (radioaktivitet) (enligt punkt 49) utsöndras i utandningsluften, då behöver inte utandningsluften samlas in i den slutgiltiga studien.

46. Varje djur ska placeras i en separat metabolisk enhet för uppsamling av urin och avföring (urin, avföring och utandningsluft). Vid slutet av varje uppsamlingsperiod (se punkterna 47–49), bör de metaboliska enheterna sköljas med lämpligt lösningsmedel (detta är känt som ”burtvätt”) för att säkerställa maximal återvinning av testkemikalien (radioaktivitet). Insamling av urin och avföring bör upphöra efter 7 dagar, eller efter att minst 90 % av den administrerade dosen har återvunnits, beroende på vilket som inträffar först.

47. De totala mängderna av testkemikalien (radioaktivitet) i urin ska bestämmas vid minst två olika tidpunkter under dag 1 av uppsamlingen, varav en 24 timmar efter dosering, och därefter dagligen till dess studien upphör. Valet av mer än två provtagningstidpunkter under dag ett (t.ex. vid 6, 12 och 24 timmar) uppmuntras. Resultaten från pilotstudier ska analyseras för information om alternativa eller kompletterande tidpunkter för insamling. En motivering ska ges för insamlingsschemana.

48. Den totala mängden testkemikalie (radioaktivitet) i avföring ska fastställas på daglig basis med början 24 timmar efter dosering tills studien avslutas, såvida inte pilotstudier föreslår alternativa eller kompletterande tidpunkter för insamling. En motivering ska ges för de alternativa insamlingsschemana.

49. Insamlingen av passerad CO_2 och andra flyktiga material kan avbrytas i ett givet studieförsök när mindre än 1 % av den administrerade dosen återfinns i utandningsluften under en 24-timmars uppsamlingsperiod.

Tidpunktsstudier

Plasma-/blodkinetik

50. Syftet med dessa studier är att få en uppskattning av grundläggande TK-parametrar (t.ex. C_{max}, T_{max}, halveringstid ($t_{1/2}$), AUC) för testkemikalien. Dessa studier kan utföras med en dos eller, mer troligt med två eller fler doser. Dosinställning bör bestämmas av försökstypen och/eller frågan som behandlas. Kinetiska data kan behövas för att lösa frågor såsom testkemikaliens biotillgänglighet och/eller för att klargöra doseffekten för godkännande (t.ex. för att klargöra huruvida godkännandet är mättat på ett dosberoende sätt).

51. För dessa studier ska minst fyra djur av samma kön per dosgrupp användas. Motivering bör ges för könet på de djur som används. Användningen av båda könen (fyra hanar och fyra honor) bör övervägas om det finns belägg för betydande könsrelaterade skillnader i toxicitet.

▼M4

52. Efter administreringen av testkemikalien (radioaktiv) ska blodprov tas från varje djur vid lämpliga tidpunkter med hjälp av lämplig provtagningsmetod. Volymen och antal blodprov som kan erhållas per djur kan begränsas genom potentiella effekter från upprepad provtagning på djurhälsa/fysiologi och/eller analysmetodens känslighet. Proven ska analyseras för varje enskilt djur. I vissa fall (t.ex. metabolitkarakterisering) kan det vara nödvändigt att samla in prover från fler än ett djur. Samlingsprover bör identifieras och en förklaring för sammanslagning bör ges. Om en radioaktiv märkt testkemikalie används kan en analys av den totala aktuella radioaktiviteten vara tillräcklig. Om så är fallet, bör den totala radioaktiviteten analyseras i helblod och plasma eller plasma och röda blodkroppar för möjliggöra en beräkning av blod-/plasmaförhållandet. Under andra omständigheter kan mer specifika undersökningar som kräver identifiering av modersubstans och/eller metaboliter, eller bedömning av proteinbindning behövas.

Övrig vävnadskinetik

53. Syftet med dessa studier är att få information om tidsförloppet för att behandla frågor rörande toxisk verkningsmekanism, bioackumulering och biopersistens genom bestämning av testkemikalienivåer i olika vävnader. Valet av vävnader och antal tidspunkter som utvärderas beror på frågan som ska behandlas och testkemikaliens toxikologiska databas. Utformningen av dessa ytterligare vävnadskinetiska studier bör ta hänsyn till den information som samlats in som beskrivs i punkterna 37–40. Dessa studier kan gälla engångsdosering eller upprepad dosering. En detaljerad motivering för den använda strategin ska ges.

54. Skäl för att utföra andra vävnadskinetiska studier kan omfatta:

— Tecken på utökad blodhalveringstid tyder på möjlig ackumulering av testkemikalien i olika vävnader eller

— intresse av om en stabil tillståndsnivå har uppnåtts i vissa vävnader (även om en stabil tillståndsnivå av en testkemikalie kan ha uppnåtts kan det finnas intresse av att veta att en stabil tillståndsnivå också har uppnåtts i målvävnader i t.ex. studier med upprepad dosering).

55. För dessa typer av tidförloppsstudier bör en lämplig oral dos av testkemikalien administreras till minst fyra djur per dos per tidpunkt och tidsförloppet för distributionen övervakas i utvalda vävnader. Endast ena könet får användas om inte könsspecifik toxicitet observeras. Om total radioaktivitet eller moderkemikalien och/eller metaboliter analyseras beror på den fråga som behandlas. Bedömning av vävnadsdistributionen bör göras med lämpliga metoder.

Enzyminduktion/inhibition

56. Studier som tar upp eventuella effekter av enzyminduktion/inhibition eller biotransformation av testkemikalien som studeras kan krävas i ett eller flera av följande fall:

1) Tillgängliga uppgifter tyder på ett samband mellan biotransformering av testkemikalien och ökad toxicitet.

2) Tillgängliga toxicitetsdata tyder på ett ickelinjärt förhållande mellan dos och metabolism.

▼M4

3) Resultatet av metabolitidentifieringsstudier visar identifiering av en potentiell toxisk metabolit som kan ha producerats av en enzymväg som inducerats av testkemikalien.

4) För att förklara effekter som antas vara kopplade till enzyminducerade fenomen.

5) Om toxikologiskt signifikanta förändringar i den metaboliska profilen hos testkemikalien observeras antingen *in vitro*- eller *in vivo*-försök med olika arter eller villkor, kan karakteriseringen av involverad enzym(er) behövas (t.ex. fas I-enzymer såsom isoenzymer av cytokrom P450-beroende mono-oxygenassystemet, fas II-enzymer såsom isoenzymer av sulfotransferas eller uridindifosfat glukuronosyltransferas, eller andra relevanta enzymer). Denna information kan användas för att utvärdera relevansen av art till art extrapoleringar.

57. Lämpliga studieprotokoll för att värdera testkemikalierelaterade förändringar i TK, lämpligt validerade och motiverade bör användas. Exempelstudieutformning utgörs av upprepad dosering med omärkt testkemikalie, följt av en radioaktivt märkt engångsdos dag 14 eller upprepad dosering med radioaktivt märkt testkemikalie och provtagning dag 1, 7 och 14 för bestämning av metabolita profiler. Upprepad dosering med radioaktivt märkta kemikalier kan också ge information om bioackumulering (se punkt 26).

KOMPLETTERANDE METODER

58. Kompletterande metoder bortom in vivo-försök som beskrivs i denna testmetod kan ge nyttig information om absorption, distribution, metabolism eller eliminering av en testkemikalie i vissa arter.

Användning av *in vitro*-information

59. Flera frågor som rör metabolism av testkemikalien kan behandlas i in vitro-studier med lämpliga testsystem. Nyligen isolerade eller odlade hepatocyter och subcellulära fraktioner (t.ex. mikrosomer och cytosol eller S9-fraktioner) från levern kan användas för att studera eventuella metaboliter. Lokal metabolism i målorganet t.ex. lungan kan vara av intresse vid riskbedömningen. För dessa ändamål kan mikrosomala fraktioner av målorgan vara användbara. Studier med mikrosomer kan vara användbara för att hantera potentiella kön- och livsetappsskillnader och karakterisera enzymparametrar (K_m och V_{max}) som kan hjälpa till vid bedömningen av dosberoende metabolism i förhållande till exponeringsnivåer. Dessutom kan mikrosomer vara användbara för att identifiera de specifika mikrosomala enzymer som är involverade i metabolismen av testkemikalien som kan vara relevanta i artextrapolering (se också punkt 56). Potentialen för induktion av metabolism kan också undersökas genom leversubcellulära fraktioner (t.ex. mikrosomer och cytosol) av djur som förbehandlats med testkemikalien i fråga, in vitro via hepatocytinduktionsstudier eller från specifika cellinjer som uttrycker relevanta enzymer. Under vissa omständigheter och under lämpliga förhållanden kan subcellulära fraktioner som kommer från mänskliga vävnader övervägas för bestämning av potentiella artskillnader i biotransformation. Resultaten från in vitro-undersökningar kan också vara användbara i utvecklingen av PBTK-modeller (5).

▼M4

60. In vitro-hudabsorptionsstudier kan också ge kompletterande information för att karakterisera absorption (6).

61. Primära cellkulturer från leverceller och färska vävnadsskivor kan användas för att behandla liknande frågor som med levermikrosomer. I vissa fall kan det vara möjligt att svara på specifika frågor med hjälp av cellinjer med definierade uttryck av det relevanta enzymet eller modifierade cellinjer. I vissa fall kan det vara användbart att studera inhiberingen och induktionen av specifika cytokrom P450-isozymer (t.ex. CYP1A1, 2E1, 1A2 och andra) och/eller fas II-enzymer av modersubstansen med hjälp av in vitro-studier. Informationen som erhålls kan användas för liknande strukturerade föreningar.

Användning av toxikokinetiska data från toxicitetsstudier som kompletterande information

62. Analys av blod, vävnad och/eller avföringsprover som erhållits under genomförandet av eventuella andra toxicitetsstudier kan ge data om biotillgänglighet, förändringar i plasmakoncentration i tid (AUC, C_{max}), bioackumuleringspotential, nedbrytningshastighet och köns- eller livsskedesförändringar i metabolism och kinetik.

63. Övervägande av studiens utformning kan användas för att besvara frågor som rör mättad absorption, biotransformering eller utsöndringsvägar vid högre dosnivåer, hanteringen av nya metaboliska vägar vid högre doser och begränsningen av toxiska metaboliter för högre doser.

64. Andra farobedömningsöverväganden kan omfatta frågor såsom:

— Åldersrelaterad känslighet på grund av skillnader i statusen för blod-hjärnbarriären, njuren och/eller avgiftningskapaciteten.

— Subpopulationskänslighet på grund av skillnader i biotransformeringskapacitet eller andra TK-skillnader.

— Omfattningen av exponeringen av fostret genom transplacental överföring av kemikalier eller hos de nyfödda genom digivning.

Användning av toxikokinetisk modellering

65. Toxikokinetiska modeller kan vara användbara för olika faro- och riskbedömningsaspekter som till exempel förutsägelsen av systematisk exponering och intern vävnadsdos. Vidare kan specifika frågor om verkningsmekanism behandlas, och dessa modeller kan ge en grund för extrapolering mellan arter, exponeringsvägar, doseringsmönster och mänsklig riskbedömning. Data som är användbara för utvecklandet av PBTK-modeller för en testkemikale för en given art inkluderar 1) fördelningskoefficienter, 2) biokemiska konstanter och fysiologiska parametrar, 3) vägspecifika absorptionsparametrar och 4) in vivo-kinetiska data för modellutvärdering (t.ex. nedbrytningsparametrar för relevanta (> 10 %) utsöndringsvägar, K_m och V_{max} för metabolism). Försöksdatan som används vid modellutvecklingen ska genereras med vetenskapligt sunda metoder och modellresultaten ska valideras. Testkemikalie och artspecifika parametrar såsom absorptionshastighet, blodvävnadspartitionering och metaboliska hastighetskonstanter bestäms ofta för att underlätta utvecklingen av oberoende eller fysiologiskt baserade modeller (7).

▼M4

DATA OCH RAPPORTERING

66. Det rekommenderas att studierapporten innehåller en innehållsförteckning.

Rapportens huvuddel

67. Rapportens huvuddel ska innehålla information som omfattas av denna testmetod indelad i avsnitt och punkter enligt följande:

Sammanfattning

68. Denna del av studien ska innehålla en sammanfattning av studiens utformning och en beskrivning av metoderna som använts. Den bör också belysa de viktigaste resultaten avseende massbalans, arten och omfattningen av metaboliter, vävnadsrester, nedbrytningshastighet, bioackumuleringspotential, könsskillnader etc. Sammanfattningen bör presenteras i tillräcklig detalj för att möjliggöra en bedömning av resultaten.

Inledning

69. Denna del av rapporten ska omfatta studiens mål, motiv och utformning såväl som lämpliga referenser och eventuell bakgrundshistoria.

Material och metoder

70. Denna del av rapporten ska innehålla detaljerade beskrivningar av all relevant information, inklusive:

a) Testkemikalie

Denna underavdelning ska innehålla identifiering av testkemikalien: Kemiskt namn, molekylstruktur, kvalitativ och kvantitativ bestämning av dess kemiska sammansättning, kemisk renhet och när det så möjligt, typ och mängd av eventuella orenheter. Den bör också innehålla information om fysikalisk/kemiska egenskaper, inklusive fysiskt tillstånd, färg, bruttolöslighet och/eller fördelningskoefficient, stabilitet, och om så är lämpligt, frätande egenskaper. Om tillämpligt ska information om isomerer lämnas. Om testämnet är radioaktivt bör information om följande ingå i denna underavdelning: Typen av radionuklid, läge för märkning, specifik aktivitet och radiokemisk renhet.

Typ eller beskrivning av eventuell vehikel, spädningsmedel, suspenderingsmedel och emulgeringsmedel eller andra material som används vid administreringen av testkemikalien bör anges.

b) Försöksdjur

Denna underavdelning ska innehålla information om försöksdjuren, inklusive val och motivering av art, stam, ålder vid studiens inledning, kön samt kroppsvikt, hälsotillstånd och djurhållning.

c) Metoder

Denna underavdelning ska innehålla detaljer om studiens utformning och metod som används. Den ska innehålla en beskrivning av:

1) Motivering för varje ändring av exponeringsväg och exponeringsförhållanden, om tillämpligt.

▼M4

2) Motivering för valet av dosnivåer.

3) Beskrivning av pilotstudier som används i den experimentella utformningen av uppföljningsstudier, om tillämpligt. Pilotstudiens underlag ska lämnas in.

4) Hur doseringslösningen bereddes och typen av lösningsmedel eller vehikel, om någon, som används.

5) Antal behandlingsgrupper och antal djur per grupp.

6) Doseringsnivåer och volym (och specifik dosaktivitet då radioaktivitet används).

7) Väg och metod för administrering.

8) Doseringsfrekvens.

9) Fasteperiod (om sådan används).

10) Total radioaktivitet per djur.

11) Djurhantering.

12) Provtagning och hantering.

13) Analysmetoder som används för separering, kvantifiering och identifiering av metaboliter.

14) Detektionsgräns för de använda metoderna.

15) Andra experimentella mätningar och förfaranden som används (inklusive validering av metoder för metabolitanalys).

d) Statistisk analys.

Om statistisk analys används för att analysera studieresultaten ska tillräcklig information om analysmetoden och de datorprogram som används ingå, så att en oberoende granskare/statistiker kan omvärdera och rekonstruera analysen.

När det gäller systemmodellstudier såsom PBTK bör presentationen av modellerna innehålla en fullständig beskrivning av modellen för att tillåta en oberoende rekonstruktion och validering av modellen (se punkt 65 och Tillägg: Definitioner).

Resultat

71. All data ska sammanfattas i tabellform med lämplig statistisk utvärdering och beskrivas i texten i denna avdelning. Radioaktivitetsdata ska sammanfattas och presenteras på lämpligt sätt för studien, vanligtvis i mikrogram- eller milligramekvivalenter per massa för provet, även om andra enheter kan användas. Denna avdelning bör innehålla grafiska illustrationer, reproduktion av representativa kromatografiska och spektrometriska data, metabolitidentifiering/kvantifiering och föreslagna metaboliska vägar inklusive metaboliternas molekylstruktur. Vidare ska följande information ingå i denna avdelning, om tillämpligt:

1) Kvantitet och procentandel av återvinning i urin, avföring, utandningsluft, samt urin och avföring i burtvätt.

— För dermala studier ska även data inkluderas beträffande återvinning av testkemikalien från behandlad hud, hudtvätt och kvarvarande radioaktivitet i huden vilket omfattar utrustning och metabolisk enhet samt resultaten från hudtvättsstudien. För fortsatt diskussion se punkterna 74–77.

▼M4

— Inhalationsstudier ska även innehålla data om återvinning av testkemikalien från lungor och nasala vävnader (8). För fortsatt diskussion se punkt 78.

2) Vävnadsfördelning rapporteras som procent av administrerad dos och koncentration (mikrogramekvivalenter per gram vävnad), och vävnad-blod eller vävnad-plasma-förhållanden.

3) Materialbalans utvecklad ur varje studie som inbegriper analys av kroppsvävnader och utsöndringar.

4) Plasmakoncentrationer och toxikokinetiska parametrar (biotillgänglighet, AUC, Cmax, Tmax, nedbrytning, halveringstid) efter administrering genom relevant väg(ar) för exponering.

5) Hastighet och omfattning av absorption av testkemikalien efter administrering genom relevant väg(ar) för exponering.

6) Mängden testkemikalie och metaboliter (rapporterad som en procentandel av den administrerade dosen) som uppsamlas från avföringen.

7) Hänvisning till tilläggsdata som innehåller individuella djurdata från alla kvantitativa endpoints (t.ex. dosadministrering, procentandel återvinning, koncentrationer, TK-parametrar etc.).

8) En figur med de föreslagna metaboliska vägarna och metaboliternas molekylära strukturer.

Diskussion och slutsatser

72. I detta avsnitt bör författaren/författarna:

1) Föreslå en metabolisk väg på grundval av resultaten från testkemikaliens metabolism och disposition.

2) Diskutera eventuella art- och könskillnader när det gäller disposition och/eller biotransformering av testkemikalien.

3) Ställa upp i tabellform och diskutera identifieringen och omfattningen av metaboliter, nedbrytningshastighet, bioackumuleringspotential och nivå på moderämne i vävnadsrester och/eller metabolit(er) såväl som möjliga dosberoende förändringar i TK-parametrar, i förekommande fall.

4) I detta avsnitt integrera eventuella relevanta TK-data som erhållits i samband med genomförandet av toxicitetsstudier.

5) Ge en kortfattad slutsats som kan stödjas av resultaten från studien.

6) Tillagda avsnitt (som behövs eller är lämpliga).

73. Ytterligare avsnitt bör användas för att inkludera stöd för bibliografisk information, tabeller, figurer, tillägg etc.

▼M4

ALTERNATIVA EXPONERINGSVÄGAR

Hud

Hudbehandling

74. Det här avsnittet innehåller specifik information om undersökningen av testkemikaliens toxikokinetik vid administrering via huden. För hudabsorption ska kapitel B.44 i denna bilaga (hudabsorption: in vivo-metod (9)) konsulteras. För andra endpoints såsom distribution och metabolism kan den här testmetoden B.36 användas. En eller flera dosnivåer för testkemikalien ska användas vid dermal behandling. Testkemikalien (t.ex. rent, utspätt eller berett material som innehåller testkemikalien vilken appliceras på huden) ska vara samma (eller ett realistiskt surrogat) som människor eller andra potentiella målarter kan exponeras för. Dosnivån(erna) ska väljas i enlighet med punkterna 20–26 i denna testmetod. Faktorer som kan tas i övervägande i dermalt dosval inkluderar förväntad mänsklig exponering och/eller doser vid vilka toxicitet observerades i andra dermala toxicitetsstudier. Den dermala dosen(erna) bör upplösas, om nödvändigt, i en lämplig vehikel och appliceras i en tillräcklig volym för att leverera de doserna. Strax före testet ska pälsen klippas på ryggdelen på försöksdjurens bål. Rakning kan användas, men det bör göras cirka 24 timmar före testet. Vid klippning eller räkning av pälsen ska försiktighet iakttas så att huden inte skadas, vilket kan ändra dess genomtränglighet. Cirka 10 % av kroppsytan bör göras ren för applicering av testkemikalien. Vid mycket toxiska kemikalier kan den yta som täcks vara mindre än 10 %, men en så stor del av området som möjligt ska täckas med en tunn och jämn film. Samma behandling av ytan ska användas för alla dermala testgrupper. De doserade områdena ska skyddas med lämpligt skydd som sitter på plats. Djuren bör inhysas separat.

75. En dermal tvättstudie bör genomföras för att bedöma mängden applicerad dos av testkemikalien som kan avlägsnas från huden genom tvättning av den behandlade huden med en mild tvål och vatten. Denna studie kan också ge stöd i upprättandet av massbalans när testkemikalien administreras via huden. För denna dermala tvättstudie bör en engångsdos av testkemikalien appliceras på två djur. Val av dosnivå är i enlighet med punkt 23 i denna testmetod (se även punkt 76 för diskussion om hudkontakttid). Mängderna av testkemikalien som återvunnits i tvättarna bör fastställas för att bedöma effektiviteten vid borttagningen av testkemikalien genom tvättproceduren.

76. Såvida den inte hindras av korrosionsverkan bör testkemikalien appliceras och hållas på huden i minst 6 timmar. Vid tidpunkten för borttagandet av skyddet bör det behandlade området tvättas enligt förfarandet i den dermala tvättstudien (se punkt 75). Både skyddet och tvättarna ska analyseras för kvarvarande testkemikalie. Vid studiens upphörande ska varje djur avlivas skonsamt i enlighet med (2) och den behandlade huden ska avlägsnas. En lämplig del av behandlad hud ska analyseras för att bestämma kvarvarande testkemikalie (radioaktivitet).

77. För toxikokinetisk bedömning av läkemedel kan olika förfaranden i enlighet med lämpligt regelverk behövas.

▼M4

Inhalation

78. En engångskoncentration (eller mer vid behov) av testkemikalien bör användas. Koncentrationen(erna) ska väljas i enlighet med punkterna 20–26 i denna testmetod. Inhalationsbehandlingar ska utföras med hjälp av utrustning för ”noskon” eller ”enbart huvud” för att förhindra absorption genom alternativa vägar för exponering (8). Om andra villkor för inhalationsexponering används bör motiveringen för ändringen dokumenteras. Varaktigheten av exponering genom inhalation bör definieras, normalt är exponeringen 4–6 timmar.

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 N°19, ENV/JM/MONO(2000), OECD, Paris.

(3) Solon E G, Kraus L (2002). Quantitative whole-body autoradiography in the pharmaceutical industry; Survey results on study design, methods, and regulatory compliance, J Pharm and Tox Methods 46: 73–81.

(4) Stumpf WE (2005). Drug localization and targeting with receptor microscopic autoradiography. J. Pharmacological and Toxicological Methods 51: 25–40.

(5) Loizou G, Spendiff M, Barton HA, Bessems J, Bois FY, d'Yvoire MB, Buist H, Clewell HJ 3rd, Meek B, Gundert-Remy U, Goerlitz G, Schmitt W. (2008). Development of good modelling practice for physiologically based pharmacokinetic models for use in risk assessment: The first steps. Regulatory Toxicology and Pharmacology 50: 400–411.

(6) Kapitel B.45 i denna bilaga, hudabsorption: in vitro-metod.

(7) IPCS (2010). Characterization and application of Physiologically-BasedPharmacokinetic Models in Risk Assessment. IPCS Harmonization Project Document No 9. Geneva, World Health Organization, International Programme on Chemical Safety.

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

(9) Kapitel B.44 i denna bilaga, hudabsorption: in vivo-metod.

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

(11) Gibaldi M and Perrier D, (1982), Pharmacokinetics, 2nd edition, Marcel Dekker, Inc., New York.

▼M4

Tillägg

DEFINITIONER

Absorption: Process(er) med upptag av kemikalier i eller genom vävnader. Absorption avser moderföreningen och alla dess metaboliter. Inte att förväxla med ”biotillgänglighet”.

Ackumulering (Bioackumulering): Ökning av mängden testkemikalie över tid i vävnader (vanligtvis fettvävnader, efter upprepad dosering); om tillförseln av en testkemikalie i kroppen är större än den hastighet med vilken den elimineras, ackumulerar organismen testkemikalien och toxiska koncentrationer av testkemikalien kan uppnås.

ADME: Förkortning för absorption, distribution, metabolism och exkretion.

AUC: (arean under plasmakoncentration-tid-kurvan): Arean under kurvan i ett diagram för koncentrationen av testkemikalien i plasma över tiden. Den representerar den totala mängden testkemikalie som absorberas av kroppen inom en förutbestämd tidsperiod. Vid linjära förhållanden är AUC (från tiden noll till oändligheten) proportionell mot den totala mängden av en testkemikalie som absorberas av kroppen, oavsett graden av absorption.

Autoradiografi (helkropps-autoradiografi): Används för att avgöra kvalitativ och/eller kvantitativ vävnadslokalisering av en radioaktiv testkemikalie. Denna teknik använder röntgenfilm eller på senare tid digital fosforimaging för att visualisera radioaktivt märkta molekyler eller fragment av molekyler genom att registrera strålningen som emitteras i det objekt som studeras. Kvantitativ helkropps-autoradiografi kan, jämfört med organdissektion, ha vissa fördelar för utvärdering av testkemikaliens distribution och bedömningen av den totala återvinningen och upplösningen av radioaktivt material i vävnader. En betydande fördel är, till exempel, att den kan användas för en pigmenterad djurmodell för att utvärdera eventuell association av testkemikalien med melanin, som kan binda vissa molekyler. Medan det kan ge bekväma helkroppsöversikter av bindningsställen med hög kapacitet-låg affinitet, kan denna teknik dock vara begränsad i att känna igen specifika målställen såsom receptor-bindningsställen där relativ hög upplösning och hög känslighet behövs för detektering. När autoradiografi används bör försöket som syftar till att bestämma massbalansen för den administrerade föreningen utföras som en separat grupp eller i en separat studie från vävnadsfördelningsförsöket, där alla exkret (vilket även kan inkludera utandningsluft) och hela kroppen homogeniseras och analyseras genom vätskescintillationsräkning.

Gallexkretion: Exkretion via gallgångarna.

Bioackumulering: Se ”ackumulering”.

Biotillgänglighet: Fraktion av en administrerad dos som når det stora kretsloppet eller görs tillgänglig på platsen för fysiologisk aktivitet. Normalt refererar testkemikaliens biotillgänglighet till modersubstansen, men skulle kunna hänvisa till dess metabolit. Den anses endast ha en kemisk form. *Observera*: Biotillgänglighet och absorption är inte detsamma. Skillnaden mellan t.ex. oral absorption (dvs. närvaron i tarmväggen och portal cirkulation) och biotillgänglighet (dvs. närvaron i systemblod och i vävnader) kan uppstå från kemisk nedbrytning på grund av metabolism i tarmväggen eller utflödestransport tillbaka till lumen i magsäcken eller presystemisk metabolism i levern, bland andra faktorer (10). Biotillgängligheten för den toxiska komponenten (modersubstans eller en metabolit) är en kritisk parameter i riskbedömningen för människor (hög till lågdos-extrapolering, väg till extrapolering) för härledning av ett internt värde från externa NOAEL eller BMD (tillämpad dos). Det är den orala absorptionen som räcker för leverpåverkan vid oral administrering. Dock för varje påverkan annat än vid portalen för inträde, är det biotillgängligheten som i allmänhet är en mer pålitlig parameter för vidare användning i riskbedömningen, inte absorptionen.

▼M4

Biopersistens: Se ”persistens”.

Biotransformation: (Vanligtvis enzymatisk) kemisk omvandling av testkemikalien av intresse, till en annan kemikalie i kroppen. Synonymt med metabolism.

C_{max}: Antingen maximal (toppvärde) koncentration i blodet (plasma/serum) efter administrering eller maximal (toppvärde) utsöndring (i urin eller avföring) efter administrering.

Nedbrytningshastighet: Kvantitativt mått på den hastighet vid vilken testkemikalien förs bort från blodet, plasman eller en viss vävnad per tidsenhet.

Kammare: Strukturell eller biokemisk del (eller enhet) av ett organ, vävnad eller cell, som är skild från resten.

Avgiftningsvägar: Serier av steg som leder till eliminering av toxiska kemikalier från kroppen, antingen genom metabolisk förändring eller exkretion.

Distribution: Spridning av en testkemikalie och dess derivat i en organism.

Enzymer/isozymer: Proteiner som katalyserar kemiska reaktioner. Isozymer är enzymer som katalyserar liknande kemiska reaktioner men skiljer sig i sin aminosyresekvens.

Enzymatiska parametrar: K_m: Michaelis konstant och V_{max}: maximal hastighet.

Exkretion: Process(er) genom vilken en administrerad testkemikalie och/eller dess metaboliter avlägsnas från kroppen.

Exogent: Införd från eller producerad utanför organismen eller systemet.

Extrapolering: Slutledning av en eller flera okända värden på grundval av det som är känt eller har observerats.

Halveringstid ($t_{1/2}$): Den tid det tar för koncentrationen av testkemikalien att minska med hälften i en kammare. Den refererar normalt till plasmakoncentrationen av testkemikalien i hela kroppen.

Induktion/enzyminduktion: Enzymsyntes som svar på en miljömässig stimulans eller en inducermolekyl.

Linjäritet/linjär kinetik: En process är linjär med avseende på kinetik när alla överföringshastigheter mellan kammare står i proportion till de mängder eller koncentrationer som är närvarande dvs. första ordningen. Följaktligen är nedbrytnings- och distributionsvolymerna konstanta såväl som halveringstiderna. De uppnådda koncentrationerna är proportionella med doseringshastigheten (exponering), och ackumuleringen är lättare förutsägbar. Linjäritet/icke-linjäritet kan bedömas genom att jämföra relevanta parametrar t.ex. AUC efter olika doser eller efter engångsexponering och upprepad exponering. Avsaknad av dosberoende kan vara tecken på mättnad av enzymer involverade i metabolismen i föreningen, en ökning av AUC efter upprepad exponering jämfört med engångsexponering kan vara tecken på inhibering av metabolismen, och en minskning av AUC kan vara en indikation på induktion av metabolismen (se även (11))

▼M4

Massbalans: Redovisning av när testkemikalien inträder i och lämnar systemet.

Materialbalans: Se massbalans.

Toxicitetsmekanism (sätt)/verkningsmekanism (sätt): Verkningsmekanism avser specifika biokemiska interaktioner genom vilka en testkemikalie alstrar dess effekt. Verkningssätt hänvisar till mer allmänna vägar som leder till en testkemikalies toxicitet.

Metabolism: Synonymt med biotransformering.

Metaboliter: Produkter av metabolism eller metaboliska processer.

Oral absorption: Den procentuella andelen testkemikaliedos absorberad från administreringsstället (dvs. matspjälkningskanalen). Denna kritiska parameter kan användas för att förstå fraktionen av den administrerade testkemikalien som når portvenen och därefter levern.

Partialkoefficient: Även känd som fördelningskoefficienten som är ett mått på den differentiella lösligheten av en kemikalie i två lösningsmedel.

Toppblodnivåer (plasma/serum): Maximal (toppvärde) blodkoncentration (plasma/serum) efter administrering (se även ”C_{max}”).

Persistens (biopersistens): Långsiktig närvaro av en kemikalie (i ett biologiskt system) på grund av resistens mot nedbrytning/eliminering.

Jämförelse: Endpointinformation för en eller flera kemikalier används för att göra en förutsägelse av endpointen för målkemikalien.

Receptormikroskopisk autoradiografi (eller receptor-mikroautoradiografi): Denna teknik kan användas för att sondera xenobiotisk interaktion med specifika vävnadsställen eller cellpopulationer såsom exempelvis för receptorbindning eller specifika verkningssättstudier som kan kräva hög upplösning och hög känslighet, vilket kanske inte är möjligt med andra tekniker såsom helkropps-autoradiografi.

Administreringsväg (oral, intravenös, dermal, inhalation etc.): Avser de sätt vilka kemikalien administreras till kroppen (t.ex. oralt genom sondmatning, oralt genom foder, dermal, genom inhalation, intravenöst etc.).

Mättnad: Tillstånd där en eller flera av de kinetiska processerna (t.ex. absorption, metabolism eller nedbrytning) är vid ett maximum (läs ”mättad”).

Sensitivitet: Möjligheten för en metod eller instrument att diskriminera mellan mätningsresponser som representerar olika nivåer av en variabel av intresse.

Stationärt tillstånd för blodnivåer (plasma): Icke-jämviktstillstånd för ett öppet system där alla krafter som verkar på systemet exakt balanseras av motsatta krafter, på ett sådant sätt att alla dess komponenter är stationära i koncentrationen även om materia flödar genom systemet.

Systemmodellering (fysiologiskt baserad toxikokinetik, farmakokinetiskt baserad, fysiologiskt baserad farmakokinetisk, biologiskt baserad etc.): Abstrakt modell som använder matematiskt språk för att beskriva ett systems beteende.

Målvävnad: Vävnad i vilken en huvudsaklig skadlig effekt av ett gift manifisteras.

▼M4

Testkemikalie: Alla kemikalier eller blandningar som testas med denna testmetod.

Vävnadsfördelning: Reversibel rörelse av en testkemikalie från en plats i kroppen till en annan. Vävnadsfördelning kan studeras genom organdissekering, homogenisering, förbränning och vätskescintillationsräkning eller genom kvalitativ och/eller kvantitativ helkropps-autoradiografi. Den förstnämnda är användbar för att uppnå koncentration och procentandel av återvinning från vävnader och återstående kropp av samma djur, men kan sakna upplösning för alla vävnader och kan ha mindre än idealisk total återvinning (< 90 %). Se definition av den senare ovan.

$\mathbf{T_{max}}$: Tid för att nå C_{max}.

Toxikokinetik (farmakokinetik): Studie av absorptionen, distributionen, metabolismen och exkretionen av kemikalier över tiden.

Validering av modeller: Processen för att bedöma lämpligheten av en modell för att konsekvent beskriva tillgängliga toxikokinetiska data. Modellerna kan utvärderas via statistisk och visuell jämförelse av modellprognoser med experimentella värden mot en gemensam oberoende variabel (t.ex. tid). Omfattningen av utvärderingen bör motiveras i förhållande till den avsedda användningen av modellen.

▼B

B.37 **FÖRDRÖJD NEUROTOXICITET ORSAKAD AV ORGANISKA FOSFORFÖRENINGAR TILL FÖLJD AV AKUT EXPONERING**

1. **METOD**

1.1 INLEDNING

Vid bedömning och utvärdering av ämnens toxiska effekter är det viktigt att beakta potentialen hos substanser i vissa ämnesgrupper att framkalla specifika typer av neurotoxicitet som kanske inte upptäcks vid andra toxicitetsundersökningar. Det har observerats att vissa organiska fosforföreningar framkallar fördröjd neurotoxicitet och dessa ska beaktas för eventuell utvärdering.

Screening-tester *in vitro* får tillämpas för att identifiera de ämnen som kan framkalla fördröjd polyneuropati; negativa resultat från *in vitro*-undersökningar bevisar dock inte att testsubstansen inte skulle vara neurotoxisk.

Se Allmän inledning, del B.

1.2 DEFINITIONER

Organiska fosforföreningar omfattar icke joniserande organiska fosforestar, tioestrar eller anhydrider av organofosfor-, organofosforo- eller organofosforamidsyror eller av besläktade fosfonthio-, fosforthio- eller fosforthioamidsyror eller andra ämnen som kan framkalla sådan fördröjd neurotoxicitet som ibland observeras i denna ämnesgrupp.

Fördröjd neurotoxicitet är ett syndrom som förknippas med förlängd fördröjd debut för ataxi, distala axonopatier i ryggmärgen och perifera nerver samt hämmande och åldrande av neurotoxiskt esteras (NTE) i nervvävnad.

1.3 REFERENSÄMNEN

Ett referensämne ska testas i en positiv kontrollgrupp för att påvisa att den testade artens respons inte ändras väsentligt under försöksförhållandena i laboratoriet.

Ett exempel på en mycket använd neurotoxisk substans är triotolylfosfat (CAS 78-30-8, EINECS 201-103-5, CAS-namn: fosforsyra, tris(2-metyl-fenyl)ester), även kallad tris-o-kresylfosfat.

1.4 PRINCIP FÖR TESTMETODEN

Testsubstansen tillförs oralt i en enda dos till tamhöns som i tilllämpliga fall skyddats från akuta kolinerga effekter. Djuren observeras under 21 dagar i fråga om beteendestörningar, ataxi och förlamning. Biokemiska mätningar, särskilt inhibition av neurotoxiskt esteras (NTE) utförs på höns som väljs slumpvis ur varje grupp, normalt 24–48 timmar efter doseringen. 21 dagar efter exponeringen avlivas resterande höns och en histopatologisk undersökning av valda nervvävnader genomförs.

▼B

1.5 BESKRIVNING AV TESTMETODEN

1.5.1 **Förberedelse**

Friska unga vuxna höns som inte får medicin och som inte har virussjukdomar eller gångdefekter ska väljas slumpmässigt till behandlings- respektive kontrollgrupper och acklimatiseras till laboratorieförhållandena under minst fem dagar före undersökningens skalljan.

Burar eller inhängnader som är stora nog att ge hönsen fri rörlighet och som underlättar observation av hönsens gång ska användas.

Dosering av testsubstansen ska normalt ske oralt genom sondmatning, gelatinkapslar eller motsvarande metod. Vätska kan ges outspädd eller löst i en lämplig vehikel som majsolja; fasta ämnen ska om möjligt lösas eftersom stora doser fasta ämnen i gelatinkapslar kanske inte kan absorberas effektivt. I fråga om icke-flytande vehiklar ska vehikelns toxiska egenskaper vara kända; i annat fall ska de bestämmas före försöket.

1.5.2 **Försöksförhållanden**

1.5.2.1 *Försöksdjur*

Unga vuxna värphöns *(Gallus gallus domesticus)* i åldern 8–12 månader rekommenderas. Standardstora arter och stammar ska användas och hönsen ska normalt ha fötts upp under sådana förhållanden att de kunnat röra sig fritt.

1.5.2.2 *Antal och kön*

Utöver behandlingsgruppen ska både en vehikelkontrollgrupp och en positiv kontrollgrupp användas. Vehikelkotrollgruppen ska behandlas på samma sätt som behandlingsgruppen med undantag för att tillförsel av testsubstansen utesluts.

Tillräckligt många höns ska användas i varje grupp för att minst sex fåglar ska kunna avlivas för biokemisk bestämning (tre stycken vid vardera av två tidpunkter) och sex överleva observationsperioden på 21 dagar för patologisk undersökning.

Den positiva kontrollgruppen kan hållas parallellt eller vara en aktuell historisk kontrollgrupp. Den ska omfatta minst sex höns som behandlats med ett välkänt neurotoxiskt ämne som ger fördröjd polyneuropati, tre för biokemisk och tre för patologisk undersökning. Regelbunden uppdatering av historiska data rekommenderas. Nya positiva kontrolldata ska tas fram om någon viktig komponent (t.ex. stam, foder, förvaringsutrymmen) har ändrats av det berörda laboratoriet efter det att det tidigare försöket genomfördes.

▼B

1.5.2.3 *Dosnivåer*

En preliminär undersökning med ett lämpligt antal höns och dosnivågrupper ska utföras för att fastställa vilken nivå som ska användas i huvudundersökningen. En viss dödlighet i den preliminära undersökningen är nödvändig för att fastställa en tillräcklig dos för huvudundersökningen. För att förhindra dödsfall beroende på akuta kolinerga effekter får atropin eller något annat skyddsämne, om vilket det är känt att det inte påverkar fördröjda neurotoxiska responser, användas. En variation av testmetoder får användas för att beräkna den maximala icke-dödliga dosen av testsubstans (se metod B.l*a*). Historiska data om hönsen eller annan toxikologisk information kan också vara till hjälp vid valet av dos.

Testsubstansens dosnivå i huvudundersökningen ska vara den högsta möjliga med beaktande av resultaten från den preliminära undereökningen för dosval och den övre dosgränsen på 2 000 mg/kg kroppsvikt. Eventuella dödsfall ska inte vara fler än att tillräckligt många djur överlever för biokemi (sex stycken) och histologi (sex stycken) efter 21 dagar. Atropin eller andra skyddsämnen, om vilka det är känt att de inte påverkar fördröjda neurotoxiska responser, ska användas för att förhindra dödsfall till följd av akuta kolinerga effekter.

1.5.2.4 *”Limit-test”*

Om ett test vid en dosnivå på minst 2 000 mg/kg kroppsvikt och dag, med användning av de förfaranden som beskrivs för denna metod, inte framkallar några observerbara toxiska effekter och om toxicitet inte är att förvänta på grundval av data från strukturellt besläktade ämnen, kan en undersökning med användning av en högre dos anses överflödig. ”Limit-test” är tillämpligt, med undantag för om exponering på människor påvisar ett behov av att använda en högre dosnivå.

1.5.2.5 *Observationsperiod*

Observationsperioden ska vara 21 dagar.

1.5.3 **Förfarande**

Efter tillförsel av ett skyddsämne för att förhindra dödsfall till följd av akuta kolinerga effekter tillförs testsubstansen som engångsdos.

1.5.3.1 Allmänna observationer

Observationerna ska påskalljas direkt efter exponeringen. Samtliga höns ska observeras noggrant flera gånger under de första två dagarna och därefter minst en gång dagligen under en period på 21 dagar eller fram till planerad avlivning. Alla tecken på toxicitet ska noteras, inbegripet tid för beteendestörningarnas debut, deras typ, allvar och duration. Ataxi ska mätas enligt en ordningsskala pä minst fyra nivåer, och förlamning ska noteras. Minst två gånger per vecka ska de höns som valts ut för patologiska undersökningar tas ut från burarna och underkastas en period av påtvingad motorisk aktivitet, t.ex. klättring på stege, för att underlätta observation av minimala toxiska effekter. Döende djur och djur som lider av svår smärta ska tas bort när detta upptäcks, avlivas skonsamt och obduceras.

▼B

1.5.3.2 Kroppsvikt

Samtliga höns ska vägas just före tillförseln av testsubstansen och därefter minst en gång i veckan.

1.5.3.3 Biokemi

Sex höns väljs slumpvis från var och en av behandlings- respektive vehikelkontrollgrupperna och tre höns från den positiva kontrollgruppen (om denna grupp hålls parallellt.) Hönsen ska avlivas några dagar efter dosering, och hjärnan och lumbala delar av ryggmärgen prepareras och testas i fråga om inhibition av neurotoxiskt esteras. Därutöver kan det också vara lämpligt att preparera och testa ischiasnerwävnad i fråga om inhibition av neurotoxiskt esteras. Normalt ska tre fåglar från kontrollgruppen och varje behandlingsgrupp avlivas efter 24 timmar och tre efter 48 timmar, medan de tre hönsen från de positiva kontrollgrupperna ska avlivas efter 24 timmar. Om eventuella kliniska tecken på förgiftning (detta kan ofta bedömas genom observation vid debuten på kolinerga svar) indikerar att det toxiska ämnet kan tas upp mycket långsamt är det bättre att ta vävnadsprov från tre fåglar vid vardera av två tidpunkter mellan 24 och så sent som 72 timmar efter dosering.

Om det bedöms lämpligt kan även analyser av acetylkolinesteras (AChE) utföras på dessa prover. Spontan reaktivering av AChE kan dock uppträda *in vivo* och därmed leda till en underskattning av ämnets potential som AChE-hämmare.

1.5.3.4 Obduktion

Obduktion av samtliga djur (avlivade enligt planen och döende djur som avlivats) ska omfatta observation av hjärnans och ryggmärgens utseende.

1.5.3.5 Histopatologisk undersökning

Nervvävnad från djur som överlevt observationsperioden och som inte används för biokemiska undersökningar ska underkastas mikroskopisk undersökning. Vävnaderna ska fixeras *in situ* med användning av perfusionsteknik. Snitten ska omfatta lillhjärnan (longitudiellt, medialt), förlängda märgen, ryggmärgen och perifera nerver. Ryggradssnitten ska tas från halsområdet, mitten av brösthålan och det lumbosakrala området. Snitt från tibialnervens distala region och dess förgreningar till *musculus gastrocnemius* och ischiasnerven ska tas. Snitten ska färgas med lämplig myelin- och axonspecifik färg.

2. **DATA**

Negativa resultat i fråga om de sluteffekter som valts för denna metod (biokemi, histopatologi och beteendeobservationer) skulle normalt inte kräva ytterligare tester av fördröjd neurotoxicitet. Tvetydiga eller oklara resultat i fråga om dessa sluteffekter kan komma att kräva ytterligare utvärdering.

Individuella data ska anges. Därutöver ska alla data sammanfattas i tabellform som för varje testgrupp visar antalet djur vid försökets skalljan, antalet djur som uppvisar skador, beteendeeffekter eller biokemiska effekter, typen och allvaret av dessa skador eller effekter och procentandelen djur som uppvisar respektive typ och grad av allvar av skada eller effekt.

▼B

Resultaten av denna undersökningen ska utvärderas i fråga om fördelning, allvar och korrelation mellan beteendeeffekter, biokemiska och histopatologiska effekter och eventuellt andra observerade effekter i behandlings- och kontrollgrupperna.

Numeriska resultat ska utvärderas genom lämpliga och allmänt erkända statistiska metoder. De statistiska metoder som används ska väljas vid utformandet av undersökningen.

3. **RAPPORTERING**

FÖRSÖKSRAPPORT

Försöksrapporten ska om möjligt innehålla följande uppgifter:

Försöksdjur

— Använd stam.

— Antal djur och deras ålder.

— Källa, förvaringsförhållanden etc.

— Djurens individuella vikt vid försökets skalljan.

Försöksförbållanden:

— Uppgifter om testsubstansen, stabilitet och homogenitet i tillämpliga fall.

— Motivering av val av vehikel.

— Uppgifter om tillförseln av testsubstansen.

— Uppgifter om foder- och vattenkvalitet.

— Grund för val av dos.

— Specifikation av tillförda doser, inbegripet uppgifter om vehikel, volym och det tillförda mate rialets fysiska form.

— Benämning på och uppgifter om tillförsel av eventuellt skyddsämne.

Resultat:

— Uppgifter om kroppsvikt.

— Uppgifter om toxisk respons per grupp, inbegripet dödsfall.

— De kliniska observationernas art, allvar och duration (reversibilitet ska anges).

— En detaljerad redogörelse för biokemiska metoder och resultat.

— Obduktionsresultat.

— En detaljerad redogörelse för alla histopatologiska resultat.

— Statistisk bearbetning av resultat i tillämpliga fall.

Diskussion om resultaten.

Slutsatser.

4. **HÄNVISNINGAR**

Denna metod motsvarar OECD TG 418.

▼B

B.38 **FÖRDRÖJD NEUROTOXICITET ORSAKAD AV ORGANISKA FOSFORFÖRENINGAR 28 DAGARS UPPREPAD DOSUNDERSÖKNING**

1. **METOD**

1.1 INLEDNING

Vid bedömning och utvärdering av ämnens toxiska effekter är det viktigt att beakta potentialen hos substanser inom vissa ämnesgrupper att framkalla vissa typer av neurotoxicitet som kanske inte upptäcks vid andra toxicitetsundersökningar. Det har observerats att vissa organiska fosforföreningar framkallar fördröjd neurotoxicitet och dessa ska beaktas för eventuell utvärdering.

Screening-tester *in vitro* får tillämpas för att identifiera de ämnen som kan framkalla fördröjd polyneuropati; negativa resultat från *in vitro*-undersökningar bevisar dock inte att testsubstansen inte skulle vara neurotoxisk.

Denna 28 dagars undersökning av fördröjd neurotoxicitet ger information om de tänkbara hälsorisker som troligen uppstår till följd av upprepad exponering under en begränsad tidsperiod. Den ger information om dosrespons och kan ge en beräkning av en NOAEL-nivå som kan vara användbar för att fastställa säkerhetsföreskrifter om exponering.

Se även Allmän inledning, del B.

1.2 DEFINITIONER

Organiska fosforföreningar omfattar icke joniserande organiska fosforestrar, tioestrar eller anhydnder av organofosfor-, organofosforo- eller organofosforamidsyror eller av besläktade fosfonthio-, fosforthio- eller fosforthioamidsyror eller andra ämnen som kan framkalla sådan fördröjd neurotoxitet som ibland observeras i denna ämnesgrupp.

Fördröjd neurotoxicitet är ett syndrom som förknippas med förlängd fördröjd debut för ataxi, di-stala axonopatier i ryggmärgen och perifera nerver samt hämmande och åldrande av neurotoxiskt esteras (NTE) i nervvävnad.

1.3 PRINCIP FÖR TESTMETODEN

Testsubstansen tillförs dagligen oralt till tamhöns under 28 dagar. Djuren observeras minst en gång dagligen i fråga om beteendestörningar, ataxi och förlamning till dess det gått 14 dagar efter den sista dosen. Biokemiska mätningar, särskilt inhibition av neurotoxiskt esteras (NTE) utförs på höns som väljs slumpvis ur varje grupp, normalt 24 – 48 timmar efter doseringen. Två veckor efter den sista dosen avlivas resterande höns och en histopatologisk undersökning av valda neuralvävnader genomförs.

▼B

1.4 BESKRIVNING AV TESTMETODEN

1.4.1 **Förberedelser**

Friska unga vuxna höns som inte får medicin och som inte har virussjukdomar eller gångdefekter ska väljas slumpmässigt till behandlings- respektive kontrollgrupper och acklimatiseras till laboratorieförhållandena under minst fem dagar före undersökningens skalljan.

Burar eller inhängnader som är stora nog att ge hönsen fri rörlighet och som underlättar observation av hönsens gång ska användas.

Oral dosering ska ske dagligen sju dagar i veckan, helst genom sondmatning eller tillförsel av gelatinkapslar. Vätska kan ges outspädd eller löst i en lämplig vehikel som majsolja; fasta ämnen ska om möjligt lösas eftersom stora doser fasta ämnen i gelatinkapslar kanske inte kan absorberas effektivt. I fråga om icke-flytande vehiklar ska vehikelns toxiska egenskaper vara kända; i annat fall ska de bestämmas före försöket.

1.4.2 **Försöksförhållanden**

1.4.2.1 *Försöksdjur*

Unga vuxna värphöns *(Gallus gallus domesticus)* i åldern 8 – 12 månader rekommenderas. Standardstora arter och stammar ska användas och hönsen ska normalt ha fötts upp under sådana förhållanden att de kunnat röra sig fritt.

1.4.2.2 *Antal och kön*

Vanligen bör minst tre behandlingsgrupper och en vehikelkontrollgrupp användas. Vehikelkontrollgruppen ska behandlas på samma sätt som behandlingsgruppen med undantag för att tillförsel av testsubstansen utesluts.

Tillräckligt många höns ska användas i varje grupp för att minst sex fåglar ska kunna avlivas för biokemisk bestämning (tre stycken vid vardera två tidpunkter) och sex överleva en 14 dagar lång observationsperiod efter behandlingen för patologisk undersökning.

1.4.2.3 *Dosnivåer*

Dosnivåerna ska väljas med beaktande av resultaten från ett akut test av fördröjd neurotoxicitet eller andra befintliga toxicitets- eller kinetiska data som finns tillgängliga i fråga om testsubstansen. Den högsta dosnivån ska väljas i syfte att inducera toxiska effekter, helst fördröjd toxicitet, men inte dödsfall eller svårt lidande. Därefter ska dosnivåer fastställas i en fallande skala i syfte att påvisa eventuella dos-responssamband och NOAEI. vid den lägsta dosnivån.

▼B

1.4.2.4 *”Limit-test”*

Om ett test vid en dosnivå på minst 1 000 mg/kg kroppsvikt och dag, med användning av de förfaranden som beskrivs för denna undersökning, inte framkallar några observerbara toxiska effekter och om toxicitet inte är att förvänta på grundval av data om strukturellt besläktade ämnen kan en undersökning med en högre dos anses överflödig. ”Limit-test” är tillämpligt, med undantag för om exponering på människor indikerar att det finns behov av att använda en högre dosnivå.

1.4.2.5 *Observationsperiod*

Samtliga djur ska observeras minst en gång dagligen under exponeringsperioden och därefter under 14 dagar, med undantag för planerad dissektion.

1.4.3 **Förfarande**

Djuren doseras med testsubstansen sju dagar i veckan under en period på 28 dagar.

1.4.3.1 *Allmänna observationer*

Observationerna ska påskalljas direkt efter exponeringen. Samtliga höns ska observeras minst en gång dagligen under de 28 behandlingsdagarna och under minst 14 dagar efter dosering eller fram till planerad avlivning. Alla tecken på toxicitet ska noteras, inbegripet tid för beteendestörningarnas debut, deras typ, allvar och duration. Observationerna ska omfatta, men inte begränsas till, beteendeavvikelser. Ataxi ska mätas enligt en ordningsskala på minst fyra nivåer, och förlamning ska noteras. Minst två gånger per vecka ska hönsen tas ut från burarna och underkastas en period av påtvingad motorisk aktivitet, t.ex. klättring på stege, för att underlätta observation av minimala toxiska effekter. Döende djur och djur som lider av svår smärta ska tas bort när detta upptäcks, avlivas skonsamt och obduceras.

1.4.3.2 *Kroppsvikt*

Samtliga höns ska vägas just före tillförseln av testsubstansen och därefter minst en gång i veckan.

1.4.3.3 *Biokemi*

Sex höns väljs slumpvis från var och en av behandlings- respektive vehikelkontrollgrupperna och avlivas några dagar efter doseringen, och hjärnan och lumbala delar av ryggmärgen prepareras och testas i fråga om inhibition av neurotoxiskt esteras. Därutöver kan det också vara lämpligt att preparera och testa ischiasnervvävnad i fråga om inhibition av neurotoxiskt esteras. Normalt ska tre fåglar från kontrollgruppen och var och en av behandlingsgrupperna avlivas efter 24 timmar och tre 48 timmar efter den sista doseringen. Om data från den akuta undersökningen eller andra undersökningar (t.ex. toxikokinetik) indikerar att andra tidpunkter för avlivning är att föredra efter slutdosering så ska dessa tidpunkter tillämpas och grunden för detta dokumenteras.

Om det bedöms lämpligt kan även analyser av acetylkolinesteras (AChE) utföras på dessa prover. Spontan reaktivering av AChE kan dock uppträda *in vivo* och därmed leda till en underskattning av ämnets potential som AChE-hämmare.

▼B

1.4.3.4 *Obduktion*

Obduktion av samtliga djur (avlivade enligt planen och döende djur som avlivats) ska omfatta observation av hjärnans och ryggmärgens utseende.

1.4.3.5 *Histopatologisk undersökning*

Nervvävnad från djur som överlevt observationsperioden och som inte används för biokemiska undersökningar ska underkastas mikroskopisk undersökning. Vävnaderna ska fixeras *in situ* med användning av perfusionsteknik. Snitten ska omfatta lillhjärnan (longitudiellt, medialt), förlängda märgen, ryggmärgen och perifera nerver. Ryggradssnitten ska tas från halsområdet, mitten av brösthålan och det lumbosakrala området. Snitt från tibialnervens distala region och dess förgreningar till *musculus gastrocnemius* och ischiasnerven ska tas. Snitten ska färgas med lämplig myelin- och axonspecifik färg. Inledningsvis ska mikroskopundersökning utföras på de bevarade vävnaderna av samtliga djur i kontroll- respektive högdosgruppen. Om det finns bevis på effekter i högdosgruppen ska mikroskopundersökning även utföras på hönsen från mellan- och lågdos-grupperna.

2. **DATA**

Negativa resultat i fråga om de sluteffekter som valts för denna metod (biokemi, histopatologi och beteendeobservationer) skulle normalt inte kräva ytterligare tester av fördröjd neurotoxicitet. Tvetydiga eller oklara resultat i fråga om dessa sluteffekter kan komma att kräva ytterligare utvärdering.

Individuella data ska anges. Därutöver ska alla data sammanfattas i tabellform som för varje testgrupp visar antalet djur vid försökets skalljan, antalet djur som uppvisar skador, beteendeeffek-tcr eller biokemiska effekter, typen och allvaret av dessa skador eller effekter och procentandelen djur som uppvisar respektive typ och grad av allvar av skada eller effekt.

Resultaten av denna undersökning ska utvärderas i fråga om fördelning, allvar och korrelation mellan beteendeeffekter, biokemiska och histopatologiska effekter och eventuellt andra observerade effekter i behandlings- och kontrollgrupperna.

Numeriska resultat ska utvärderas genom lämpliga och allmänt erkända statistiska metoder. De statistiska metoder som används ska väljas vid utformandet av undersökningen.

3. **RAPPORTERING**

FÖRSÖKSRAPPORT

Försöksrapporten skal! om möjligt innehålla följande uppgifter:

Försöksdjur

— Använd stam.

— Antal djur och deras ålder.

— Källa, förvaringsförhållanden etc.

— Djurens individuella vikt vid försökets skalljan.

▼B

Försöksförhållanden:

— Uppgifter om testsubstansen, stabilitet och homogenitet i tillämpliga fall.

— Motivering för val av vehikel.

— Uppgifter om tillförseln av testsubstansen.

— Uppgifter om foder- och vattenkvalitet.

— Grund för val av dos.

— Specifikation av tillförda doser, inbegripet uppgifter om vehikel, volym och det tillförda mate rialets fysiska form.

— Grund för att välja andra tidpunkter för biokemisk bestämning om de inte motsvarar 24 re spektive 48 timmar.

Resultat:

— Uppgifter om kroppsvikt.

— Uppgifter om toxisk respons per grupp, inbegripet dödsfall.

— Nivå för no-observed adverse effect.

— De kliniska observationernas art, allvar och duration (reversibilitet ska anges).

— En detaljerad redogörelse för biokemiska metoder och resultat.

— Obduktionsresultat.

— En detaljerad redogörelse för alla histopatologiska resultat.

— Statistisk bearbetning av resultat i tillämpliga fall.

Diskussion om resultaten.

Slutsatser.

HÄNVISNINGAR

Denna metod motsvarar OECD TG 419.

▼B

B.39 TEST AV REPARATIONSSYNTES (UDS) HOS LEVERCELLER FRÅN DÄGGDJUR IN-VIVO

1. METOD

Denna metod är en kopia av testet OECD TG 486, Test av reparationssyntes (UDS) hos leverceller från däggdjur *in vivo* (Unscheduled DNA Synthesys (UDS) Test with Mammalian Liver Celler *in Vivo* (1997)).

1.1 INLEDNING

Ändamålet med testet av reparationssyntes (UDS) hos leverceller från däggdjur in *vivo* är att identifiera testsubstanscr som inducerar DNA-reparation i leverceller från behandlade försöksdjur (se (1) (2) (3) (4).

Detta in vivo-test erbjuder en metod för undersökning av genotoxiska effekter av kemikaler i levern. Slutpunktsmätning är indikativt för DNA-skador och påföljande reparation i leverceller. Levern är vanligen det huvudsakliga sätet för metabolismen av absorberade ämnen. Det är således ett lämpligt säte för att mäta DNA-skador *in vivo.*

Om det finns bevis för att testsubstansen inte kommer att nå målvävnaden är det inte lämpligt att använda detta test.

Reparationssyntesens slutpunkt mäts genom att bestämma upptaget av märkta nukleosider i celler som inte undergår reguljär DNA syntes (S-fas). Den teknik som är den mest använda är bestämning av upptag av triti-ummärkt tymidin (H-TdR) med hjälp av autoradiografi. Råttlever används med fördel för UDS-tester *in vivo.* Andra vävnader än lever kan användas, men omfattas inte av denna metod.

Detektionen av ett UDS-svar är beroende av antalet DNA-baser som ”klipps bort” och byts ut vid platsen för skadan. UDS-testet är därför särskilt värdefullt för att detektera substansinducerad ”longpatch”-reparation (20–30 baser). ”Shortpatch”-reparation (1–3 baser) detekteras däremot med mycket lägre känslighet. Vidare kan mutagena händelser inträffa på grund av utebliven reparation, felreparation eller felreplikation av DNA-skador. Omfattningen av UDS-svaret ger ingen indikation på noggrannheten i reparationsprocessen. Dessutom är det möjligt att ett mutagen reagerar med DNA men att DNA-skadan inte repareras via en reparationsprocess där DNA-baser ”klipps bort” och byts ut. Bristen på specifik information rörande mutagen aktivitet, erhållen genom UDS-testet, kompenseras för genom dess potentiella känslighet, eftersom den mäts i hela genomet.

Se även Allmän inledning, del B.

1.2 DEFINITIONER

celler som repareras: ett nettoantal korn i kärnan (net nuclear grain, NNG) som är större än ett förvalt värde, vilket ska verifieras av det laboratorium som utför testet.

nettoantal korn i kärnan (NNG): kvantitativ mätning av UDS-aktivitet hos celler i autoradiografiska UDS-tester, beräknade genom att subtrahera medelantalet av de cytoplasmiska kornen i kärnekvivalenta cytoplasmiska områden (CG) från antalet korn i kärnan (nuclear grains, NG): NNG = NG-CG. NNG-räkningar beräknas för individuella celler och slås sedan samman för celler i en kultur, i parallella kulturer, etc.

▼B

reparationssyntes (UDS): DNA-reparationssyntes efter ”bortklippning” och avlägsnande av en DNA-sträng som innehåller ett avsnitt med skador inducerats av kemiska substanser eller fysiska ämnen. (UDS)

1.3 TESTMETODENS PRINCIP

UDS-testet med leverceller från däggdjur *in* vivo indikerar DNA-reparationssyntes efter ”bortklippning” och avlägsnande av en sträng med DNA innehållande ett avsnitt med skador, vilka inducerats av kemiska substanser eller fysiska ämnen. Testet baseras i vanliga fall på en inkorporering av ^{3}H-TdR i DNA hos leverceller, vilka har en låg frekvens av celler som befinner sig i cellcykelns S-fas. Upptaget av ^{3}H-TdR bestäms vanligen genom autoradiografi. eftersom denna teknik inte ar sä mottaglig för interferens från celler i S-fas som, t.ex. vätske-scintillationsräkning

1.4 BESKRIVNING AV METODEN

1.4.1 **Förberedelser**

1.4.1.1 *Val av djurarter*

Vanligen används råttor men det går även bra att använda ett annat lämpligt däggdjur. Man bör välja de stammar av unga, friska vuxna försöksdjur som vanligen används på laboratorier. När undersökningen ska påbörjas, är det lämpligt att viktskillnaden mellan djuren är så liten möjligt och den bör inte överstiga ±20 % av medelvikten för varje kön.

1.4.1.2 *Förhållanden vid förvaring och utfodring*

De generella förhållanden som anges i den Allmänna inledningen till del B gäller. Man bör dock sträva efter en relativ luftfuktighet på 50–60 %.

1.4.1.3 *Förberedelse av djuren*

Friska, unga och vuxna försöksdjur väljs ut slumpartat för placering i kontroll- och behandlingsgrupperna. Burar bör arrangeras på ett sådant sätt att möjliga effekter beroende på placeringen av burarna blir så små som möjligt. Djuren ska ha en unik identifiering och hållas i sina burar under minst fem dagar innan undersökningen börjar, för att göra det möjligt för dem att acklimatiseras till förhållandena i laboratoriet.

1.4.1.4 *Berdninq av testsubstansen*

Testsubstanser i fast form bör lösas upp i eller blandas med lämpliga lösningsmedel eller vehiklar och spädas ut, om så är lämpligt, innan dosen administreras till försöksdjuren. Testsubstanser i flytande form kan doseras direkt eller så späds de ut före dosering. Nygjorda beredningar av testsubstansen bör användas om inte stabilitetsdata visar att lagring är acceptabelt.

1.4.2 **Försöksbetingelser**

1.4.2.1 *Lösningsmedel/vehikel*

Lölsningsmedlet/vehikeln bör inte ge upphov till toxiska effekter vid de dosnivåer som används och bör inte kunna misstänkas för att reagera kemiskt med testsubstansen. Om andra lösningsmedel/vehiklar än gängse brukliga används, bör användningen av dem ha stöd från data som visar på deras kompatibilitet. När det är möjligt, rekommenderas att man i första hand överväger vattenbaserade lösningsmedel/vehiklar.

▼B

1.4.2.2 *Kontroller*

Samtidiga positiva och negativa kontroller (lösningsmedel/vehikel) bör ingå i varje oberoende utförd del av experimentet. Förutom vid behandling med testsubstansen, bör försöksdjuren i kontrollgrupperna hanteras på ett identiskt sätt i förhållande till djuren i de grupper där behandling skett.

Positiva kontroller bör utgöras av substanser som är kända för att ge UDS när de administreras vid exponeringsnivåer som kan förväntas att ge en detekterbar ökning jämfört med bakgrunden. Positiva kontroller som kräver metabolisk aktivering bör användas vid doser som framkallar ett måttligt svar (4). Doserna kan väljas på ett sådant sätt att effekterna är tydliga men att de inte omedelbart avslöjar identiteten hos kokade utstryksglas för läsaren. I tabellen nedan ges några exempel på positiva kontrollsubstanser.

Tider for provtagning	Substans	CA S-nummer	EINECS-nummer
Tidiga provtagningstider (2–4 tim.)	N-Nitrosodimethylamin	62-75-9	200-249-8
Sena provtagningstider (12–16 tim.)	N-2-Fluorenylacetamid (2-AAF)	53-96-3	200-188-6

Andra lämpliga positiva kontrollsubstanser kan används. Det är acceptabelt att den positiva kontrollen administreras via en annan tillförselväg än testsubstansen.

1.5 FÖRFARANDE

1.5.1 **Försökdjurens antal och kön**

Ett lämpligt antal försöksdjur bör användas, för att man ska kunna ta hänsyn till den naturliga biologiska variationen hos testresultaten. Antalet försöksdjur bör utgöras av minst tre analyserbara försöksdjur per grupp. Där det finns en signifikant historiks databas som har ackumulerats, krävs det endast ett eller två försöksdjur för de samtidiga negativa och positiva kontrollgrupperna.

Om det vid tiden för undersökningen visar sig att det finns data som är tillgängliga från undersökningar på samma stam och där samma tillförselväg för exponering har använts, samt att dessa visar att det inte finns några betydande skillnader i toxicitet mellan könen, kan testning på endast ett kön, helst på hanar, vara tillräckligt. I de fall där exponering av människa för kemikaler kan ge könsspecifika resultat, som t.ex. för vissa läkemedel, bör testet utföras med försöksdjur av lämpligt kön.

1.5.2 **Behandlingsschema**

Testsubstanser administreras i allmänhet i form av en enstaka behandling.

1.5.3 **Dosnivåer**

Normalt används minst två olika dosnivåer. Den högsta dosen definieras som dos vilken producerar tecken på toxicitet på ett sådant sätt att högre dosnivåer, baserade på en likadan doseringsregim, skulle förväntas leda till letalitet. I allmänhet bör den lägre dosen vara 50 % till 25 % av den högre dosen.

▼B

Substanser med specifika biologiska verkningar vid låga icke-toxiska doser (såsom hormoner och mitogena substanser) kan utgöra undantag med avseende pa de dosbestämmande kriterierna och bör utvärderas från fall till fall. Om en undersökning för att bestämma intervallet utförs på grund av att det inte finns några lämpliga data tillgängliga, bör denna utföras i samma laboratorium, och där man använder samma arter, stammar, kön och behandlingsschema som i huvudundersökningen.

Den högsta dosen kan även definieras som en dos vilken producerar en indikation på toxicitet i levern (t.ex. pyknotiska kärnor).

1.5.4 **Limit-test**

En fullständig undersökning kan inte anses vara nödvändig om ett test på en dosnivå vid minst 2 000 mg/kg kroppsvikt och med en enstaka behandling, eller i form av två behandlingar under samma dag, inte ger upphov till observerbara toxiska effekter, och om ingen genotoxicitet kan förväntas utifrån data om strukturellt relaterade substanser. En förväntad exponering av människor kan visa på behovet av att en högre dosnivå används i ”limit-testen”.

1.5.5 **Administrering av doser**

Testsubstansen administreras vanligen via sondmatning genom att använda en magsond eller en lämplig intubationskanyl. Andra tillförselvägar för exponering kan vara acceptabla, där de kan motiveras. Den intraperitoneala vägen rekommenderas dock inte, eftersom den skulle kunna exponera levern direkt för testsubstansen snarare än via det cirkulatoriska systemet. Den maximala vätskevolymen som kan administreras genom sondmatning eller injektion vid ett tillfälle beror av försöksdjurets storlek. Volymen bör inte överskrida 2 ml/100 g kroppsvikt. Användningen av större volymer måste motiveras. Förutom när det gäller irriterande eller korro-.siva substanser, vilka normalt kommer att avslöja förvarade effekter vid högre koncentrationer, bör variationer av testvolymen minimeras genom en justering av koncentrationen, så att konstant volym kan säkerställas vid alla dosnivåer.

1.5.6 **Beredning av leverceller**

I normala fall bereds leverceller från behandlade försöksdjur 12–16 timmar efter dosering. Ytterligare en tidig provtagningstidpunkt (normalt 2–4 timmar efter behandlingen) är normalt nödvändig om inte det finns ett tydligt positivt svar efter 12–16 timmar. Alternativa provtagningstidpunkter kan används när det är motiverat utifrån toxikokinetiska data.

Kortvariga kulturer med leverceller från däggdjur startas genom att skölja lever in situ med kollagenas och att låta nyligen dissocierade leverceller fästa sig på en lämplig yta. Leverceller från negativa kontrollförsöksdjur bör ha en viabilitet (5) på minst 50 %.

1.5.7 **Bestämning av UDS**

Nyligen isolerade leverceller från däggdjur inkuberas normalt med ett medium som innehåller ^{3}H-TdR under en tid som är tillräckligt lång, t.ex. 3–8 timmar. När inkubationsperioden går mot sitt slut, bör mediet avlägsnas från cellerna, vilken sedan kan inkuberas i ett medium som innehåller ett överskott på omärkt tymidin för att försvaga oinkorporerad radioaktivitet (”cold chase”). Cellerna tvättas sedan, fixeras och torkas. Vid längre inkubationstider, kan ”cold chase” visa sig vara onödigt. Utstryksglas doppas sedan i en autoradiografisk emulsion, exponeras i mörker (t.ex. nedkylda under 7–14 dagar) framkallas och färgas in, varpå exponerade silverkorn sedan räknas. Två till tre utstryksglas bereds från varje försöksdjur.

▼B

1.5.8 **Analys**

Preparationerna av utstryksglas bör innehålla tillräckligt många celler med normal morfologi för att medge en meningsfull bestämning av UDS. Preparationer undersöks mikroskopiskt efter tecken på uppenbar cytotoxicitct (t.ex. pyknos, reducerade nivåer av radioaktiv märkning).

Utstryksglas bör kodas innan kornen räknas. Normalt påvisas 100 celler från varje försöksdjur från minst två utstryksglas. om mindre än 100 celler/försöksdjur påvisas bör detta motiveras. Vid kornräkningar påvisas inte kärnor i S-fas, men proportionen av celler i S-fas kan registreras.

Mängden av ^{3}H-TdR som inkorporerats i kärnan och cytoplasman hos morfologiskt normala celler, som bevisats av upplagringen av silverkorn, bör bestämmas med hjälp av lämpliga metoder.

Kornräkningar bestäms i kärnorna (nuclear grains, NG) och kärnekvivalenta områden i cytoplasman (cytoplasmic grains, CG). CG-räkningar mäts genom att antingen ta det område av cytoplasman som har den mest omfattande märkningen, eller genom att ta ett medeltal av två eller tre slumpmässiga cytoplasmaräkningar nära kärnan. Andra räknemetoder (t.ex. helcellsräkning) kan användas om de kan motiveras (6).

2. **DATA**

2.1 BEHANDLING AV RESULTATEN

Individuella utstryksglas och försöksdjursdata bör tas fram. Dessutom bör alla data sammanfattas i tabellform. Räkningar av nettoantalet korn i kärnan (NNG) bör tas fram för varje cell, för varje försöksdjur och för varje dos och tid genom att subtrahera CG-räkningar från NG-räkningar. Om ”celler under reparation” räknas in, bör kriterierna för definition av ”celler under reparation” vara motiverade och baserade på historiska eller samtidiga negativa kontrolldata. Numeriska resultat kan utvärderas utifrån statistiska metoder. Om statistiska tester används, bör de selekteras och motiveras innan undersökningen utförs.

2.2 UTVÄRDERING OCH TOLKNING AV RESULTATEN

Exempel på kriterier för positiva/negativa svar innefattar:

positiva	i)	NNG-värden över ett förvalt tröskelvärde som är motiverat på basis av historiska laboratoriedata
eller	ii)	NNG-värden som är signifikant större än den samtidiga kontrollen
negativa	i)	NNG-värden inom/under det historiska kontrolltröskelvärdet
eller	ii)	NNG-värden som inte är signifikant större än den samtidiga kontrollen

▼B

Den biologiska relevansen hos registrerade data bör uppmärksammas: d.v.s. parameter såsom variationer mellan olika försöksdjur, dos/respons-förhållanden och cytotoxicitetet bör också beaktas. Statistiska metoder kan användas såsom en hjälp vid utvärderingen av testresultaten. Statistisk signifikans bör dock inte vara den enda faktor som bestämmer om resultatet är positivt.

Även om de flesta experiment kommer att ge tydligt positiva eller negativa resultat, kan uppsättningen av data i sällsynta fall göra det omöjligt att utföra en otvetydig bedömning med avseende på testsubstansens aktivitet. Resultatet kan förbli tvetydigt eller tveksamt, oavsett hur många gånger som experimentet upprepas.

Ett positivt resultat från UDS-testet på leverceller från däggdjur *in vivo* indikerar att testsubstansen inducerar DNA-skador i leverceller från däggdjur in vivo, vilka kan repareras av reparartionssyntes in vitro. Ett negativt resultat indikerar att testsubstansen, under försöksbetingelserna, inte inducerar skador på DNA som är detekterbara med hjälp av detta test.

Sannolikheten för att testsubstansen eller dess metaboliter ska nå ut i det stora kretsloppet eller specifikt till målvävnaden (t.ex. systemisk toxicitet) bör diskuteras.

3. **RAPPORTERING**

TESTRAPPORT

Testrapporten måste innehålla följande information:

Lösningsmedel/vehikel:

— motivering för valet av vehikel

— testsubstansens stabilitet och löslighet i lösningsmedel/vehikeln, om detta är känt

Försöksdjur:

— art/stam som används

— försöksdjurens antal, ålder och kön

— ursprung, förhållanden vid förvaring, diet, etc.

— individuell vikt hos försöksdjuren vid försökets början, inklusive kroppsviktsintervallet, medelvärde och standardavvikelse för varje grupp

Försöksbetingelser:

— positiva och negativa kontroller (vehikel/lösningsmedel)

— data från en undersökning av spännvidden, om en sådan har utförts

— grund för valet av dosnivå

— uppgifter om beredningen av testsubstansen

— uppgifter om administreringen av testsubstansen

— grund för det sätt administreringen sker på

— metoder för att verifiera att testsubstansen nådde det stora kretsloppet eller målvävnaden, om detta är tilllämpbart

▼B

— omvandling från koncentration av testsubstansen i diet/dricksvatten (ppm) till den verkliga dosen (mg/kg kroppsvikt/dag), om detta är tillämpbart

— uppgifter om fodrets och vattnets kvalitet

— detaljerad beskrivning av behandlings- och provtagningsscheman

— metoder för matning av toxicitet

— metod för beredning och odling av leverceller

— den autoradiografiska teknik som använts

— antalet utstryksglas som preparerats och antalet celler som påvisats

— kriterier för utvärdering

— kriterier för att bedöma om undersökningarna är positiva, negativa eller tvetydiga

Resultat:

— individuella utstryksglas, försöksdjurs- och gruppmedelvärden för antalet korn i kärnan, cytoplasmiska korn, och nettoantalet korn i kärnan (NNG)

— dos/respons-förhållande, om detta är tillgängligt

— statistisk utvärdering, om en sådan utförts

— tecken på toxicitet

— samtidiga negativa (lösningsmedel/vehikel) och positiva kontrolldata

— historiska negativa och positiva kontrolldata (lösningsmedel/vehikel) med intervall, medelvärden och stan dardavvikelser

— antalet ”celler under reparation”, om detta har fastställts

— antalet celler i S-fas, om detta har bestämts

— cellernas viabilitet

Diskussion av resultaten.

Slutsatser.

4. **HÄNVISNINGAR**

1. Ashby, J., Lefevre, P. A., Burlison, B. and Penman, M. G. (198 5). An Assessment of the In Vivo Rat Hepatocyte DNA Repair Assay. *Mutation Res.,* 156, s. 1–18.

2. Buttervvorth, B. E., Ashby, J., Bermudez, E., 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, s. 123–133.

3. Kennelly, J. C, Waters, R., Ashby, J., Lefevre, P. A., Burlison, 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 Subcommitee on Guidelines for Mutagenicity Testing.* Report *Part II revised.* Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney s. 52–77.

▼B

4. Madle, S., Dean, S. W., Andrae, U., Brambilla, G., Burlinson, B., Doolittle, D. J., Furihata, C, Herner, T., McQueen, C. A. and Mori, H. (1993). Recommendations for the Performance of UDS Tests In Vitro and *In Vivo*. Mutation Res., 312, s. 263–285.

5. Fautz, R., Hussain, B., Efstathiou, E. and Hechenberger-Freudl, C. (1993). Assesment of the Relation Between the Initial Viability and the Attachment of Freshly Isoladet Rat Hepatocytes Used for the *In Vivo/ln Vitro* DNA Repair Assay (UDS). Mutation Res., 291, s. 21–27.

6. Mirsalis,). C, Tyson, C. K. and Butterworth, B. E. (1982). Detection of Genotoxic Carcinogens in the *InVivo/ln Vitro* Hepatocyte DNA Repair Assay. *Environ. Mutagen,* 4, s. 553–562.

▼B

B.40 ***IN VITRO-TEST* AV HUDKORROSIVITET: BESTÄMNING AV TRANSKUTANT ELEKTRISKT MOTSTÅND (TER)**

1. **METOD**

Denna testmetod motsvarar OECD TG 430 (2004).

1.1 INLEDNING

Hudkorrosivitet innebär att en irreversibel vävnadsskada uppstår i huden som en följd av att ett testmaterial [definierat enligt det internationella systemet för klassificering och märkning av kemikalier (GHS)] (1) appliceras. Denna metod bygger på ett förfarande som innebär att testmaterialets hudkorrosivitet inte testas på levande djur.

Bedömning av hudkorrosiviteten har normalt inneburit användning av försöksdjur (2). På grund av den smärta och det lidande som försöksdjuren utsätts för har översynen av testmetod B.4 gjorts på ett sådant sätt att bedömningen av hudkorrosiviteten går att göra med alternativa metoder *in vitro,* så att försöksdjur inte längre behöver användas.

Ett första steg mot att definiera alternativa testmetoder som kunde användas för testning av hudkorrosiviteten var att genomföra förvalideringsstudier (3). Efter detta gjordes en formell valideringsstudie (6)(7)(8) av *in* vitro-metoder för att bedöma hudkorrosiviteten (4)(5). Utfallet av dessa studier sammantaget med annan publicerad litteratur ledde till rekommendationen att följande tester skulle användas för bedömning av hudkorrosiviteten *in vivo* (9)(10)(1 1): ett test där en modell av human hud används (se testmetod B.40b) och bestämning av transkutant elektriskt motstånd (denna metod).

Från en valideringsstudie och andra publicerade studier rapporteras att prövningen av transkutant elektriskt motstånd (TER) på råtthud (12)(13) kan användas för en tillförlitlig särskiljning mellan ämnen som är kända för att vara hudkorrosiva och kända icke-korrosiva ämnen (5)(9).

Testet enligt denna metod gör det möjligt att identifiera kemikalier och blandningar som är hudkorrosiva. Dessutom gör testet det möjligt att identifiera icke hudkorrosiva ämnen och blandningar med stöd av annan befintlig information (t.ex. pH, förhållandet mellan struktur och aktivitet, data som gäller människor och/eller djur) (1)(2)(11)(14). Testet ger ingen information om hudirritation, inte heller ger det möjlighet till den underklassificering som är möjlig enligt det internationella systemet för klassificering och märkning av kemikalier (GHS) (1).

För en fullständig utvärdering av lokala hudeffekter efter en enda hudexponering rekommenderas den sekventiella teststrategi som finns som tillägg till testmetod B.4 (2) och som anges i det internationella systemet för klassificering och märkning (1). Denna teststrategi inbegriper *in vitro-tester* av hudkorrosivitet (enligt den häri beskrivna metoden) och hudirritation innan tester på levande djur övervägs.

▼B

1.2 DEFINITION

Hudkorrosivitet *in vivo:* innebär att en irreversibel skada uppstår i huden, det vill säga synlig nekros genom epidermis och ner i dermis efter att ett testämne har applicerats och fått verka i upp till fyra timmar. Korrosiva reaktioner kännetecknas av sår, blödning, blodiga sårskorpor och i slutet av observationsperioden på 14 dagar av missfärgning på grund av blekning av huden, håravfall på hela hudområden och ärrbildning. Histopatologi bör övervägas för att bedöma tveksamma skador.

Transkutant elektriskt motstånd (TER): är ett mått på hudens elektriska impedans, uttryckt i kΩ. Det är en enkel och robust metod för att bedöma hudens barriärfunktion genom att registrera jonflödet genom huden med en Wheatstonebrygga.

1.3 REFERENSÄMNEN

Tabell 1

Referenskemikalier

Namn	EINECS-nr	CAS-nr	
1,2-Diaminopropan	201-155-9	78-90-0	Starkt korrosivt
Akrylsyra	201-177-9	79-10-7	Starkt korrosivt
2-tert-butylfenol	201-807-2	88-18-6	Korrosivt
Kaliumhydroxid (10 %)	215-181-3	1310-58-3	Korrosivt
Svavelsyra (10 %)	231-639-5	7664-93-9	Korrosivt
Oktansyra (kaprylsyra)	204-677-5	124-07-02	Korrosivt
4-Amino-1,2,4-triazol	209-533-5	584-13-4	Icke-korrosivt
Eugenol	202-589-1	97-53-0	Icke-korrosivt
Fenetylbromid	203-130-8	103-63-9	Icke-korrosivt
Tetrakloretylen	204-825-9	27-18-4	Icke-korrosivt
Isostearinsyra	250-178-0	30399-84-9	Icke-korrosivt
4-(Metyltio)-bensaldehyd	222-365-7	3446-89-7	Icke-korrosivt

De flesta av kemikalierna i förteckningen har tagits från den förteckning över kemikalier som valdes för den internationella valideringsstudien ECVAM (4). Urvalet bygger på följande kriterier:

i) Lika många korrosiva som icke-korrosiva ämnen.

▼B

ii) Kommersiellt tillgängliga ämnen som täcker in de flesta relevanta kemiskalieklasser.

iii) Medtagande av såväl starkt korrosiva som mindre korrosiva ämnen för att göra det möjligt att särskilja ämnen på grundval av deras hudkorrosivitet.

iv) Val av kemikalier som kan hanteras i ett laboratorium utan att utgöra någon annan allvarlig risk utöver hudkorrosiviteten.

1.4 PRINCIPEN FÖR TESTMETODEN

Testämnet appliceras och får verka i upp till 24 timmar på den epidermala ytan av hudbitar i ett testsystem med två kammare där hudbitarna fungerar som skiljemembran mellan kamrarna. Hudbitarna tas från humant avlivade, 28-30 dagar gamla råttor. Korrosivt material identifieras genom sin förmåga att framkalla skador på hudens hornlager och störningar i den normala barriärfunktionen, vilket kan fastställas som en sänkning av det transkutana elektriska motståndet (TER) under ett tröskelvärde (12). För TER för råtthud har ett brytvärde på 5 kΩ valts, baserat på omfattande data för ett brett urval av kemikalier där den absoluta majoriteten av värden antingen låg klart över (ofta > 10 kΩ) eller klart under (ofta < 3 kΩ) detta värde (12). I allmänhet sänker material som inte har någon korrosiv verkan på djur inte TER under detta brytvärde, oavsett om de är hudirriterande eller inte. Vidare kan användning av andra hudberedningar eller annan utrustning ändra brytvärdet, vilket kräver ytterligare validering.

Ett färgämnesbindningssteg ingår i testförfarandet för verifiering av positiva resultat vid TER-värden runt 5 kΩ. Färgämnesbindningssteget visar om ökningen av jongenomsläpplighet beror på fysisk nedbrytning av hornlagret. TER-metoden med råtthud har visats ge förutsägbarhet för korrosiv verkan *in vivo* på kanin, fastställd med testmetod B.4 (2). Det ska påpekas att *in* vivo-kanintestet är mycket konservativt med avseende på hudkorrosiv verkan och hudirritation jämfört med lapptest på mänsklig hud (15).

1.5 BESKRIVNING AV TESTMETODEN

1.5.1 **Djur**

Råtta är den föredragna arten eftersom råttors hudkänslighet för kemikalier i detta test har visats tidigare (10). Åldern (då huden tas till vara) och råttstammen är av särskild betydelse för att säkerställa att hårsäckarna är i vilofas innan den vuxna hårtillväxten börjar.

▼B

Rygg- och flankhår från unga, ungefär 22 dagar gamla han- eller honråttor (erhållna från Wistar eller en jämförbar stam) avlägsnas noggrant med en liten sax. Därefter tvättas djuren noga och torkas sedan omsorgsfullt medan det klippta området hålls ner i antibiotikalösning (som innehåller t.ex. streptomycin, penicillin, kloramfenikol och amfotericin, i koncentrationer som hämmar bakterietillväxt). Djuren tvättas på nytt med antibiotika på tredje eller fjärde dagen efter den första tvätten och används inom 3 dagar från den andra tvätten, då hornlagret har återhämtat sig från hårborttagningen.

1.5.2 **Beredning av hudbitar**

Djuren avlivas med en human metod när de är 28-30 dagar gamla. Åldern är av stor betydelse. Huden från rygg och flank från varje djur avlägsnas sedan och överflödet av underhudsfett skalas försiktigt bort från huden. Hudbitar med en diameter på ungefär 20 mm tas ut. Hudbitarna kan lagras innan de används om det kan visas att positiva och negativa kontrolldata är likvärdiga med dem som erhålls för färsk hud.

Varje hudbit placeras över änden av ett PTFE-rör (polytetrafluoreten) så att överhuden är i kontakt med röret. En o-ring i gummi presspassas över rörets ände för att hålla huden på plats och överflödig vävnad putsas bort. Rörets och o-ringens mått visas i figur 2. O-ringen i gummi förseglas sedan till PTFE-rörets ände med vaselin. Röret fästs med en fjäderklämma i en kammare som innehåller $MgSO_4$-lösning (154 mM) (figur 1). Hudbiten ska vara helt nedsänkt i $MgSO_4$-lösningen. Upp till 10–15 hudbitar kan erhållas från ett enda råttskinn.

Innan testningen börjar mäts de båda hudbitarnas elektriska motstånd som ett kvalitetskontrollförfarande för varje djurhud. Båda bitarna ska ge värden för motståndet som är större än 10 kΩ för att återstoden av hudbitarna ska kunna användas för testet. Om motståndet är mindre än 10 kΩ ska återstående hudbitar från den aktuella huden kastas.

1.5.3 **Applicering av test- och kontrollämnen**

Parallella positiva och negativa kontroller ska användas för varje studie för att säkerställa att försöksmodellen fungerar adekvat. Hudbitar från ett enda djur ska användas. Förslag på ämnen för positiv och negativ kontroll är 10 M saltsyra respektive destillerat vatten.

Testämnen i vätskeform (150 µl) appliceras på epidermisytan inuti röret. Vid testning av ämnen i fast form appliceras en tillräcklig mängd för att säkerställa att hela epidermisytan täcks. Därefter tillförs avjoniserat vatten (150 µl) på det fasta ämnet och röret omskakas varsamt. Testämnet bör ha maximal kontakt med huden. För vissa fasta ämnen kan detta uppnås genom uppvärmning till 30 °C så att testämnet smälter eller mjuknar. Alternativt kan ämnet finfördelas till granulat eller pulver.

▼B

Varje testämne appliceras på tre hudbitar. Testämnet får verka i 24 timmar vid 20-23 °C och avlägsnas därefter genom sköljning med kranvattenstråle (upp till 30 °C). Sköljningen bör pågå till dess att inget ämne längre fås bort.

1.5.4 **TER-mätningar**

Hudens elektriska impedans uttryckt som transkutant elektriskt motstånd, TER, mäts med hjälp av växelström med låg spänning med en Wheatstonebrygga (13). Allmänna tekniska data för bryggan är 1–3 V driftspänning, en sinusformad eller rektangulär växelström på 50–1 000 Hz och ett mätområde på minst 0,1–30 kΩ. Den brygga som användes i valideringsstudien mätte induktans, kapacitans och motstånd upp till värden på 2 000 H, 2 000 μF respektive 2 Mω vid frekvenser på 100 Hz eller 1 kHz med användning av seriella eller parallella värden. För mätningen av hudkorrosivitet genom TER-bestämning registrerades motståndet vid frekvensen 100 Hz och seriella värden användes. För att sänka hudens ytspänning tillförs etanol (70 %) i tillräcklig mängd för att täcka epidermisytan. Etanolen får verka några sekunder och hälls sedan ur röret. Därefter behandlas huden med 3 ml MgSO4-lösning (154 mM). För motståndsmätningen (kΩ/hudbit) placeras mätutrustningens elektroder på hudbitens motstående båda ytor (figur 1). Elektrodernas mått och elektrodlängden under krokodilklämman framgår av figur 2. Den inre elektrodklämman hålls uppe på PTFE-röret under motståndsmätningen för att säkerställa att elektrodlängden i magnesiumsulfatlösningen hålls konstant. Den yttre elektroden placeras innanför receptorkammaren så att elektroden ligger mot kammarens botten. Avståndet mellan fjäderklämman och PTFE-rörets botten ska hållas konstant (figur 2) eftersom avståndet påverkar det erhållna motståndsvärdet. Följaktligen ska avståndet mellan den inre elektroden och hudbiten vara konstant och minimalt (1–2 mm).

Om det uppmätta motståndsvärdet överstiger 20 kΩ kan detta bero på att hudbitens epidermisyta är täckt av testämne. För att få bort ämnet kan man t.ex. sluta till PTFE-röret med tummen (som bör skyddas med handske) och skaka om röret i cirka 10 sekunder, hälla ut magnesiumsulfatlösningen och upprepa mätningen med ny $MgSO_4$-lösning.

Såväl testanordningens egenskaper och mått som försöksförfarandet kan påverka de TER-värden som erhålls. Tröskelvärdet på 5 kΩ för hudkorrosivitet togs fram utifrån data som erhållits med den specifika anordning och det specifika förfarande som beskrivs för denna metod. Andra tröskelvärden och kontrollvärden kan gälla om testbetingelserna ändras eller om en annan testanordning används. Därför måste metoden och tröskelvärdena för motstånd kalibreras genom test av ett antal referensstandarder som väljs bland de kemikalier som användes i valideringsstudien (4) (5) eller från liknande kemikalieklasser som de kemikalier som undersöks. En uppsättning lämpliga referenskemikalier listas i tabell 1.

▼B

1.5.5 **Metoder som bygger på färgämnesbindning**

Exponering för vissa icke-korrosiva material kan sänka motståndet under tröskelvärdet 5 kΩ så att joner kan flöda genom hornlagret då det elektriska motståndet minskar (5). Exempelvis kan neutrala organiska ämnen och kemikalier som har ytaktiva egenskaper (bland annat detergenter, emulgeringsmedel och andra ytaktiva ämnen) avlägsna hudlipider och därmed försämra barriärfunktionen och göra huden mer genomsläpplig för joner. Om TER-värdena för testämnena är lägre än eller omkring 5 kΩ utan någon synlig skada bör en bestämning av färgämnespenetrationen göras i kontroll och behandlad vävnad för att fastställa om de erhållna TER-värdena är en följd av ökad genomsläpplighet hos huden eller av hudkorrosivitet (3)(5). Om hudkorrosivitet föreligger och hornlagret är skadat kommer färgämnet sulforhodiamin B snabbt att tränga igenom hudytan och färga underliggande vävnad då det appliceras. Detta färgämne är stabilt mot ett brett urval av kemikalier och påverkas inte av det extraktionsförfarande som beskrivs nedan.

1.5.5.1 *Applicering och avlägsnande av färgämnet sulforhodamin B*

Efter TER-testet hälls magnesiumsulfatet bort från röret och huden granskas noga med avseende på synlig skada. Om ingen tydlig och mer omfattande skada observeras appliceras 150 µL 10-procentig (vikt i volym) lösning av färgämnet sulforhodamine B (Acid Red 52; C.I. 45100; EINECS-nummer 222-529-8; CAS-nummer 3520-42-1) i destillerat vatten på epidermisytan av alla hudbitar. Lösningen får verka i 2 timmar. Därefter avlägsnas överskott (obundet färgämne) genom tvättning av hudbitarna med kranvattenstråle (upp till rumstemperatur) i ungefär 10 sekunder. Hudbitarna tas försiktigt bort från PTFE-rören och varje hudbit placeras i en burk (t.ex. en 20 ml scintillationsburk i glas) som innehåller destillerat vatten (8 ml). Brukarna omskakas varsamt under 5 minuter för att avlägsna ytterligare överskott (obundet färgämne). Därefter upprepas sköljningen. Hudbitarna tas bort, placeras i burkar som innehåller 5 ml 30-procentig (vikt i volym) natriumdodecylsulfat (SDS) i destillerat vatten och inkuberas över natten vid 60 °C.

Efter inkubationen avlägsnas hudbitarna och slängs. Den kvarvarande lösningen centrifugeras under 8 minuter vid 21 °C (relativ centrifugalkraft cirka 175 x g). Ett 1 ml prov av supernatanten späds ut i volymförhållandet 1:5 (t.ex. 1 ml + 4 ml) med 30-procentig (vikt i volym) SDS i destillerat vatten. Lösningens optiska densitet (OD) mäts vid 565 nm.

1.5.5.2 *Beräkning av färgämneshalten*

Halten av sulforhodamin B per hudbit beräknas utifrån OD-värdena (5) (färgämnets molära extinktionskoefficient vid 565 nm = 8,7 x $l0^4$; molekylvikt = 580). Färgämneshalten bestäms för varje hudbit med hjälp av en lämplig kalibreringskurva och därefter beräknas en medelhalt för alla hudbitarna.

2. **DATA**

Motståndsvärden (kΩ) och medelhalter av färgämne (µg/hudbit) ska där det lämpar sig för testämnet liksom för positiva och negativa kontroller rapporteras i tabellform (enskilda försöksdata och medelvärden ± standarddeviation), inbegripet data för replikat och upprepade försök, medelvärden och enskilda värden.

▼B

2.1 TOLKNING AV RESULTAT

TER-medelvärdena godtas om parallella positiva och negativa kontrollvärden faller inom de godtagbara intervallen för den metod som används på testlaboratoriet. De godtagbara motståndsintervallen för metoden och anordningen som beskrivs ovan ges i följande tabell:

Kontroll	Ämne	Motstånds-intervall (kΩ)
Positiv	10 M saltsyra	0,5–1,0
Negativ	Destillerat vatten	10–25

Medelhalterna för färgämnesbindning godtas på villkor att värdena för de parallella kontrollerna ligger inom de godtagbara intervallen för metoden. Föreslagna intervall för färgämneshalt för kontrollämnena för den metod och den anordning som beskrivs ovan ges nedan:

Kontroll	Ämne	Intervall för färgämnes-halt (μg/ hudbit)
Positiv	10 M saltsyra	40–100
Negativ	Destillerat vatten	15–35

Testämnet anses vara icke-korrosivt

i) om TER-medelvärdet för testämnet är högre än 5 kΩ eller

ii) TER-medelvärdet är lägre än eller lika med 5 kΩ och

— hudbiten inte har någon synlig skada och

— medelhalten av färgämne i hudbitarna ligger väl under medelhalten av färgämne i den parallella positiva kontroll som behandlats med 10 M HCl.

Testämnet anses vara korrosivt

i) om TER-medelvärdet är mindre än eller lika med 5 kΩ och hudbiten är uppenbart skadad eller

ii) TER-medelvärdet är lägre än eller lika med 5 kΩ och

— hudbiten inte uppvisar någon synlig skada men

— medelhalten av färgämne är större än eller lika med medelhalten av färgämne i den parallella positiva kontroll som behandlats med 10 M HCl.

▼B

3. **RAPPORTERING**

3.1 TESTRAPPORT

Testrapporten måste innehålla följande information:

Test- och kontrollämnen:

— Kemiskt namn eller kemiska namn såsom IUPAC- eller CAS-namn och CAS-nummer, om dessa uppgifter är kända.

— Renhet och sammansättning av ämnet eller beredningen (i viktprocentandelar) och fysikaliskt tillstånd.

— Fysikalkemiska egenskaper, t.ex. fysikaliskt tillstånd, pH, stabilitet, vattenlöslighet, som är relevanta för studiens genomförande.

— Behandling av test- och kontrollämnen före testning, om detta är tillämpligt (t.ex. uppvärmning, finfördelning.

— Stabilitet, om denna är känd.

Försöksdjur:

— Stam och kön för använda djur.

— Djurens ålder då de användes som donatordjur.

— Ursprung, uppfödningsförhållanden, diet etc.

— Uppgifter om hudberedningen.

Försöksförhållanden:

— Kalibreringskurvor för testanordningen.

— Kalibreringskurvor för testet av färgämnesbindning.

— Detaljerade uppgifter om försöksförfarandet för TER-mätningar.

— Detaljerade uppgifter om försöksförfarandet för bestämning av färgämnesbindning, om detta är tillämpligt, om detta är tillämpligt.

— Beskrivning av eventuella modifieringar av försöksförfarandena.

— Beskrivning av eventuella utvärderingskriterier.

Resultat:

— Data i tabellform från TER- och färgämnesbindningsbestämning (om detta är tillämpligt) för enskilda djur och för enskilda hudprover.

— Beskrivning av observerade effekter.

Diskussion av resultaten.

Slutsatser.

4. **HÄNVISNINGAR**

1. OECD (2001), Harmonised Integrated Classification System for Human Health and Environmental Hazards of Chemical Substances and Mixtures. OECD Series on Testing and Assessment Number 33. ENV/JM/MONO(2001)6, Paris. http://www.olis.oecd.org/olis/2001doc.nsf/LinkTo/env-jm-mono(2001)6.

▼B

2. Testmethod B.4. Akut toxicitet: hudirriation/hudkorrosion.

3. 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., and Balls, M. (1995), A prevalidation study on *in vitro* skin corrosivity testing. The report and recommendations of ECVAM Workshop 6. ATLA 23, 219–255.

4. Barratt, M.D., Brantom, P.G., Fentem, J.H., Gerner, I., Walker, A.P., and 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.

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

6. OECD (1996), Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods, 62pp.

7. 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., and Zucco, F. (1995), Practical aspects of the validation of toxicity test procedures. The report and recommendations of ECVAM workshops. ATLA 23, s. 129–147.

8. 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. http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/guidelines/validate.pdf

9. ECVAM (1998). ECVAM News & Views. ATLA 26, s. 275–280.

10. ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods). (2002), ICCVAM evaluation of EpiDermTM, EPISKINTM (EPI-200), 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. http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/epiddocs/epis_brd.pdf.

11. OECD (2002), Extended Expert Consultation Meeting on The In Vitro Skin Corrosion Test Guideline Proposal, Berlin, 1st - 2nd November 2001, Secretariat's Final Summary Report, 27th March 2002, OECD ENV/EHS, available upon request from the Secretariat

12. Oliver, G.J.A., Pemberton, M.A., and Rhodes, C. (1986), An *in vitro* skin corrosivity test -modificationsand validation. Fd. Chem. Toxicol. 24, s. 507–512.

▼B

13. Botham, P.A., Hall, T.J., Dennett, R., McCall, J.C., Basketter, D.A., Whittle, E., Cheeseman, M., Esdaile, D.J., and Gardner, J. (1992), The skin corrosivity test *in vitro:* results of an interlaboratory trial. Toxic. in Vitro 6, s. 191–194.

14. Worth AP, Fentem JH, Balls M, Botham PA, Curren RD, Earl LK, Esdaile DJ, Liebsch M (1998), An Evaluation of the Proposed OECD Testing Strategy for Skin Corrosion. ATLA 26, s. 709–720.

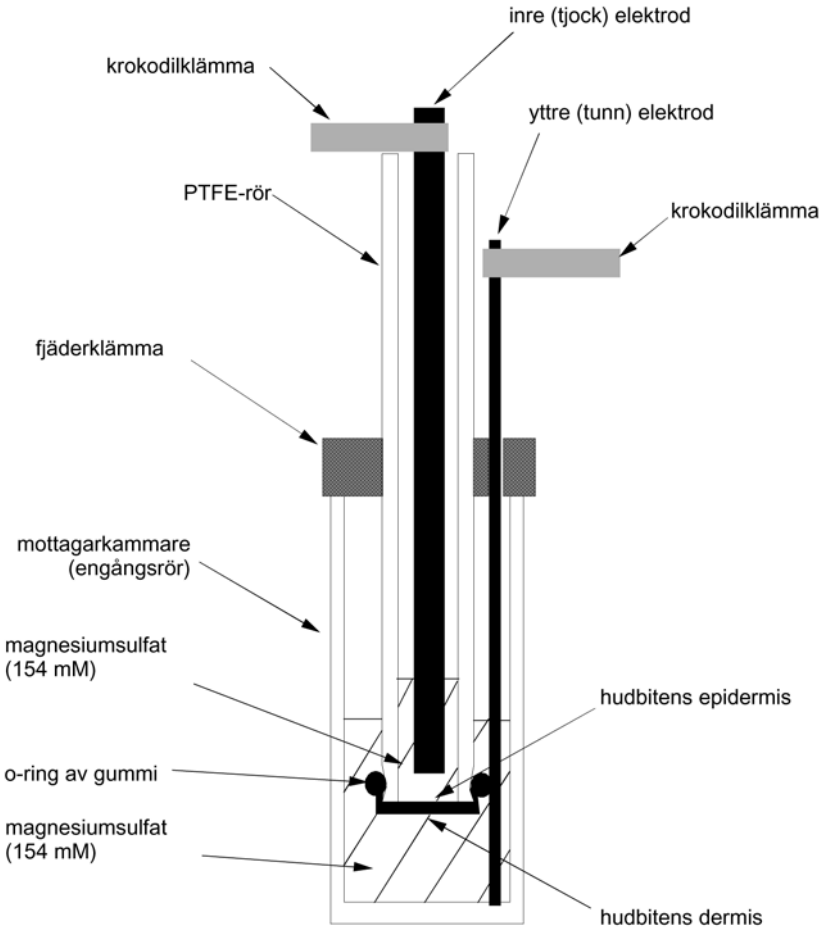
15. Basketter, D.A., Chamberlain, M., Griffiths, H.A., Rowson, M., Whittle, E., York, M. (1997), The classification of skin irritants by human patch test. Fd. Chem. Toxicol. 35, s. 845–852.

16. Oliver G.J.A, Pemberton M.A and Rhodes C. (1988), An In Vitro model for identifying skin-korrosivt chemicals. I. Initial Validation. Toxic. in Vitro. 2, s. 7–17.

▼B

Figur 1

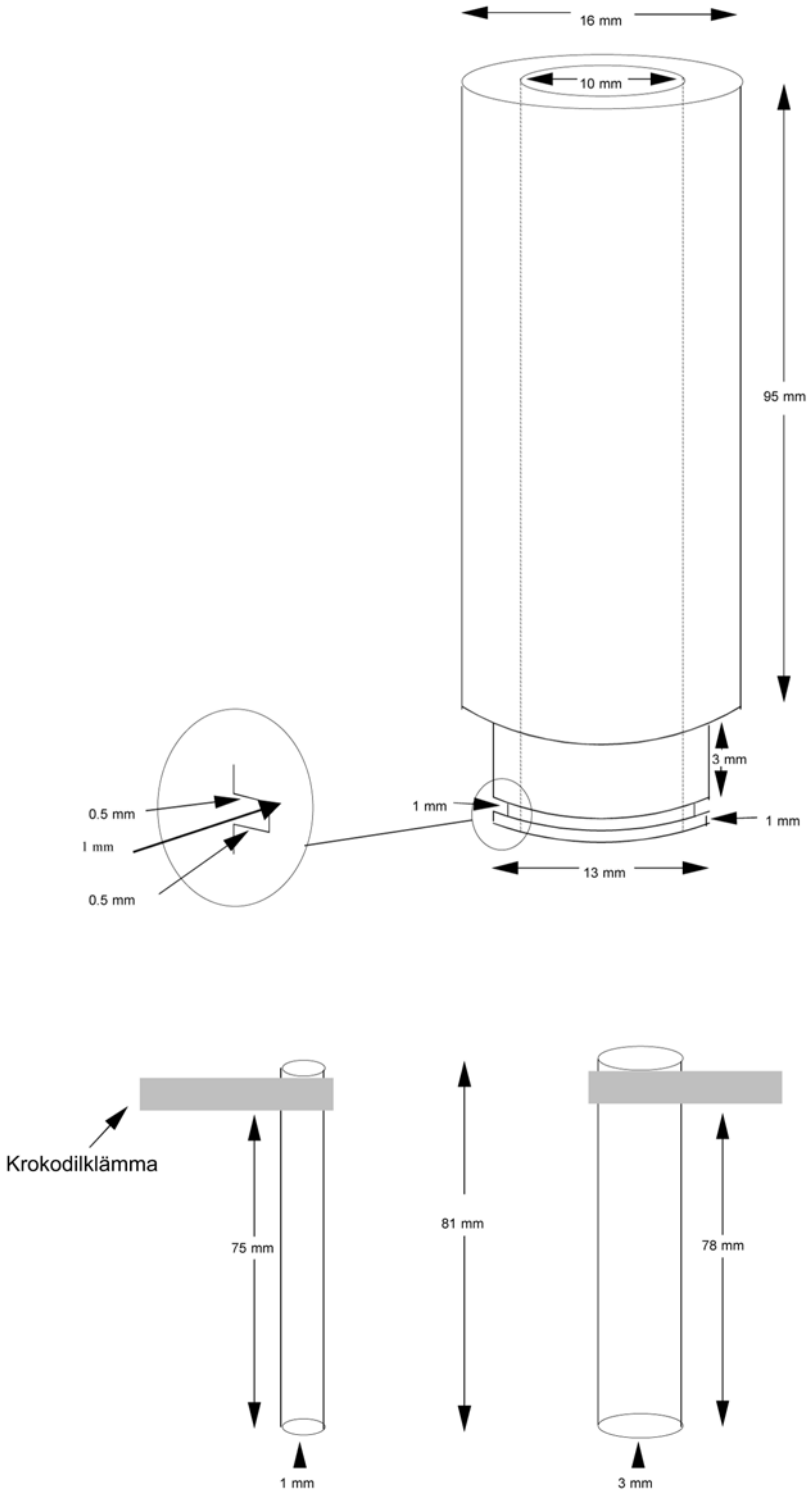
Anordning för TER-analys av råtthud



▼B

Figur 2

Mått på polytetrafluoretenrör (PFTE-rör), mottagarrör och elektroder



▼B

Kritiska faktorer för den anordning som visas ovan:

— PTFE-rörets innerdiameter.

— Elektrodernas längd jämfört med PTFE-rörets och mottagarrörets. Hudbiten ska inte vara i kontakt med elektroderna och en standardlängd av elektroden ska vara i kontakt med $MgSO_4$-lösningen.

— Mängden $MgSO_4$-lösning i mottagarröret ska ge ett visst djup i vätskan jämfört med nivån i PFTE-röret, såsom visas i figur 1.

— Hudbiten ska vara ordentligt fäst vid PFTE-röret, så att det elektriska motståndet är ett verkligt mått på hudens egenskaper.

▼B

B.40B *IN VITRO-TEST* AV HUDKORROSIVITET: TEST MED MODELL AV HUMAN HUD

1. METOD

Denna testmetod motsvarar OECD TG 431 (2004).

1.1 INLEDNING

Hudkorrosivitet innebär att en irreversibel vävnadsskada uppstår i huden som en följd av att ett testmaterial [definierat enligt det internationella systemet för klassificering och märkning av kemikalier (GHS)] (1) appliceras. Denna metod bygger på ett förfarande som innebär att testmaterialets hudkorrosivitet inte testas på levande djur.

Bedömning av hudkorrosiviteten har normalt inneburit användning av försöksdjur (2). På grund av den smärta och det lidande som försöksdjuren utsätts för har översynen av testmetod B.4 gjorts på ett sådant sätt att bedömningen av hudkorrosiviteten går att göra med alternativa metoder *in vitro,* så att försöksdjur inte längre behöver användas.

Ett första steg mot att definiera alternativa testmetoder som kunde användas för testning av hudkorrosiviteten var att genomföra förvalideringsstudier (3). Efter detta gjordes en formell valideringsstudie (6)(7)(8) av *in vitro*-metoder för att bedöma hudkorrosiviteten (4)(5). Utfallet av dessa studier sammantaget med annan publicerad litteratur (9) ledde till rekommendationen att följande tester kan användas för bedömning av hudkorrosiviteten *in vivo* (10)(11)(12)(13): ett test där en modell av human hud används (denna metod) och bestämning av transkutant elektriskt motstånd (se testmetod B.40).

Enligt valideringsstudier gör tester med modeller av human hud (3)(4)(5)(9) det möjligt att på ett tillförlitligt sätt skilja mellan kända hudkorrosiva ämnen och icke-korrosiva ämnen. Testprotokollet kan också ge en indikation för att skilja mellan mycket hudkorrosiva och mindre hudkorrosiva ämnen.

Testet enligt denna metod gör det möjligt att identifiera kemikalier och blandningar som är hudkorrosiva. Dessutom gör testet det möjligt att identifiera icke hudkorrosiva ämnen och blandningar med stöd av annan befintlig information (t.ex. pH, förhållandet mellan struktur och aktivitet, data som gäller människor och/eller djur) (1)(2)(13)(14). Testet ger ingen tillräcklig information om hudirritation, inte heller ger det möjlighet till den underklassificering som är möjlig enligt det internationella systemet för klassificering och märkning av kemikalier (GHS) (1).

För en fullständig utvärdering av lokala hudeffekter efter en enda hudexponering rekommenderas den sekventiella teststrategi som finns som tillägg till testmetod B.4 (2) och som anges i det internationella systemet för klassificering och märkning (1). Denna teststrategi inbegriper *in vitro-tester* av hudkorrosiviteten (enligt den häri beskrivna metoden) och hudirritation innan tester på levande djur övervägs.

▼B

1.2 DEFINITIONER

Hudkorrosion in vivo: innebär att en irreversibel skada uppstår i huden, det vill säga synlig nekros genom epidermis och ner i dermis efter att ett testämne har applicerats och fått verka i upp till fyra timmar. Korrosiva reaktioner kännetecknas av sår, blödning, blodiga sårskorpor och i slutet av observationsperioden på 14 dagar av missfärgning på grund av blekning av huden, håravfall på hela hudområden och ärrbildning. Histopatologi bör övervägas för att bedöma tveksamma skador.

Cellviabilitet: en parameter som är ett mått på en cellpopulations totala aktivitet (t.ex. cellulära mitokondriska dehydrogenasers förmåga att reducera det vitala färgämnet MTT). Denna förmåga är korrelerad till det totala antalet celler och till cellernas viabilitet, beroende på vilken slutpunkt som mäts och på försöksdesignen.

1.3 REFERENSÄMNEN

Tabell 1

Referenskemikalier

Namn	EINECS-nr	CAS-nr	
1,2-Diaminopropan	201-155-9	78-90-0	Starkt korrosiv
Akrylsyra	201-177-9	79-10-7	Starkt korrosiv
2-tert-butylfenol	201-807-2	88-18-6	Korrosiv
Kaliumhydroxid (10 %)	215-181-3	1310-58-3	Korrosiv
Svavelsyra (10 %)	231-639-5	7664-93-9	Korrosiv
Oktansyra (kaprylsyra)	204-677-5	124-07-02	Korrosiv
4-Amino-1,2,4-triazol	209-533-5	584-13-4	Icke-korrosiv
Eugenol	202-589-1	97-53-0	Icke-korrosiv
Fenetylbromid	203-130-8	103-63-9	Icke-korrosiv
Tetrakloretylen	204-825-9	27-18-4	Icke-korrosiv
Isostearinsyra	250-178-0	30399-84-9	Icke-korrosiv
4-(Metyltio)-benzaldehyd	222-365-7	3446-89-7	Icke-korrosiv

De flesta av kemikalierna i förteckningen har tagits från den förteckning över kemikalier som valdes för den internationella valideringsstudien ECVAM (4). Urvalet bygger på följande kriterier:

i) Lika många korrosiva som icke-korrosiva ämnen.

ii) Kommersiellt tillgängliga ämnen som täcker de flesta relevanta kemikalieklasser.

iii) Medtagande av såväl starkt korrosiva som mindre korrosiva ämnen för att göra det möjligt att särskilja ämnen på grundval av hudkorrosiviteten.

▼B

iv) Val av kemikalier som kan hanteras i ett laboratorium utan att utgöra någon annan allvarlig risk utöver hudkorrosiviteten.

1.4 PRINCIPEN FÖR TESTMETODEN

Testämnet appliceras på ytan av en tredimensionell modell av human hud som består minst av en rekonstruerad epidermis med funktionellt hornlager. Korrosiva ämnen identifieras genom sin förmåga att efter fastställda exponeringsperioder framkalla en sänkning av cellernas viabilitet (vilket kan fastställas t.ex. med MTT-reduktionsbestämning (15)) under definierade tröskelvärden. Principen för bestämningen följer hypotesen om att kemikalier är korrosiva om de kan penetrera hornlagret genom diffusion eller erosion och är tillräckligt cytotoxiska för att orsaka celldöd i underliggande cellskikt.

1.4.1 **Förfarande**

1.4.1.1 *Modeller av human hud*

Modeller av human hud kan konstrueras eller erhållas från kommersiella källor (t.ex. EpiDerm™- och EPISKIN™-modellerna) (16)(17)(18)(19) eller utvecklas eller konstrueras på försökslaboratoriet (20)(21). Det är vedertaget att användning av human hud är föremål för nationella och internationella etiska hänsyn och begränsningar. Alla nya modeller ska valideras (minst i den omfattning som beskrivs i 1.4.1.1.2). Modeller av human hud som används för detta test måste uppfylla följande villkor:

1.4.1.1.1 Allmänna villkor för modellen:

Epitelet ska konstrueras av humana keratinocyter. Flera lager av viabla epitelceller ska finnas under ett fungerande hornlager. Hudmodellen kan också ha ett lager med en stromal komponent. Hornlagret ska bestå av flera skikt och ha den lipidprofil som krävs för att barriärfunktionen ska räcka för att motstå snabb penetrering av cytotoxiska markörer. Modellens inneslutningsegenskaper ska vara sådana att ämnen inte ska kunna passera runt hornlagret till den viabla vävnaden. Om testkemikalier kan passera runt hornlagret blir modelleringen av hudexponering dålig. Hudmodellen får inte vara kontaminerad med bakterier (inbegripet mykoplasma) eller svamp.

1.4.1.1.2 Funktionella villkor för modellen:

Viabiliteten kvantifieras normalt genom användning av MTT eller andra färgämnen som omvandlas metaboliskt. I dessa fall ska den optiska densiteten (OD) för extraherat (löst) färgämne från den negativa kontrollvävnaden vara minst 20 gånger större än OD för enbart extraktionslösningsmedlet (se (22) för en översikt). Den negativa kontrollvävnaden ska vara stabil i kultur (ge motsvarande resultat vid viabilitetsmätning) under hela exponeringstiden under försöket. Hornlagret ska vara tillräckligt robust för att stå emot snabb penetrering av vissa cytotoxiska markörer (t.ex. 1-procentig Triton X-100). Denna egenskap kan uppskattas på grundval av den exponeringstid som krävs för att minska cellviabiliteten med 50 procent (ET_{50}) (denna tid är t.ex. > 2 timmar för EpiDerm™- och EPISKIN™-modellerna). Vävnaden ska vara reproducerbar över tiden och helst mellan laboratorier. Dessutom ska den kunna användas för att förutsäga den korrosiva potentialen hos referenskemikalier (se tabell 1) då den används enligt det valda försöksprotokollet.

▼B

1.4.1.2 *Applicering av test- och kontrollämnen*

Två vävnadsreplikat används för varje behandling (exponeringstid), även för kontrollerna. Ämnen i vätskeform måste appliceras i tillräcklig mängd för att täcka hudens yta (minst 25 µl/cm^2). Ämnen i fast form måste appliceras i tillräcklig mängd för att täcka huden och därefter måste ämnet fuktas med avjoniserat eller destillerat vatten för att säkerställa god kontakt med huden. I vissa fall måste ämnen i fast form pulveriseras före appliceringen. Appliceringsmetoden måste vara lämplig för testämnet (se hänvisning 5). I slutet av exponeringsperioden ska testämnet omsorgsfullt tvättas bort från hudytan med en lämplig buffert eller med 0,9-procentig NaCl.

Parallella positiva och negativa kontroller ska användas i varje studie för att säkerställa att försöksmodellen fungerar adekvat. Föreslagna ämnen för positiv kontroll är isättika eller 8N KOH. Föreslagna ämnen för negativ kontroll är 0,9-procentig NaCl eller vatten.

1.4.1.3 *Mätning av cellernas viabilitet*

Endast kvantitativa, validerade metoder får användas för att mäta cellernas viabilitet. Vidare måste viabilitetsmåttet vara förenligt med användning av den tredimensionella vävnadskonstruktionen. Ospecifik bindning av färgämne får inte störa viabilitetsmätningen. Proteinbindande färgämnen och sådana som inte genomgår metabolisk omvandling (t.ex. neutralrött) är därför olämpliga. Den oftast använda bestämningsmetoden är MTT-reduktion [3-(4,5-dimetylthiazol-2yl)-2,5-difenyltetrazoliumbromid; EINECS-nummer 206-069-5, CAS-nummer 298-93-1)], som har visat sig ge exakta och reproducerbara resultat (5), men även andra metoder kan användas (t.ex. 0,3-1 mg/ml) vid en lämplig inkubationstemperatur under 3 timmar. Den utfällda blå formazanprodukten extraheras sedan med lösningsmedel (isopropanol) och formazanhalten mäts genom OD-bestämning vid en våglängd mellan 540 och 595 nm.

Kemisk inverkan av testämnet på färgämnet kan likna inverkan av cellulär metabolism och leda till en falsk bedömning av viabiliteten. Detta har visats inträffa då ett testämne inte avlägsnas helt från huden genom sköljning (9). Om testämnet påverkar färgämnet direkt måste ytterligare kontroller användas för att upptäcka och korrigera för dessa testämnens störning av viabilitetsmätningarna (9)(23).

2. **DATA**

För varje vävnad ska OD-värden och beräknade procentvärden för cellviabilitet rapporteras i tabellform såväl för testämne som för positiva och negativa kontroller, inbegripet data för replikat och upprepade försök, medelvärden och enskilda värden

▼B

2.1 TOLKNING AV RESULTAT

De OD-värden som erhållits för varje testprov kan användas för att beräkna en procentuell viabilitet i förhållande till den negativa kontrollen, som sätts till 100 %. Tröskelvärdet för cellviabilitet som skiljer korrosiva ämnen från icke-korrosiva (eller som skiljer mellan olika korrosiva klasser) eller det statistiska förfarande eller de statistiska förfaranden som används för att utvärdera resultaten och för att identifiera korrosiva ämnen måste definieras klart och dokumenteras. Dessutom ska lämpligheten visas. Generellt fastställs dessa tröskelvärden vid optimeringen av försöket under en förvalideringsfas och bekräftas under en valideringsstudie. Ett exempel är förutsägbarheten för korrosivitet associerad till EpiDerm™-modellen (9).

Testämnet anses vara korrosivt för huden

i) om viabiliteten efter 3 minuters exponering är mindre än 50 % eller

ii) om viabiliteten efter 3 minuters exponering är större än eller lika med 50 % och viabiliteten efter 1 timmes exponering är mindre än 15 %.

Testämnet anses vara icke-korrosivt för huden

i) om viabiliteten efter 3 minuters exponering är större än eller lika med 50 % och viabiliteten efter 1 timmes exponering är större än eller lika med 15 %.

3. **RAPPORTERING**

3.1 TESTRAPPORT

Testrapporten måste innehålla följande information:

Test- och kontrollämne:

— Kemiskt namn eller kemiska namn såsom IUPAC- eller CAS-namn och CAS nummer, om dessa uppgifter är kända.

— Renhet och sammansättning av ämnet eller beredningen (i viktprocentandelar) och fysikaliskt tillstånd.

— Fysikalkemiska egenskaper, t.ex. fysikaliskt tillstånd, pH, stabilitet, vattenlöslighet, som är relevanta för studiens genomförande.

— Behandling av test- och kontrollämnen före testning, om detta är tillämpligt (t.ex. uppvärmning, finfördelning).

— Stabilitet, om denna är känd.

Motivering av hudmodellen och det använda försöksprotokollet.

Försöksförhållanden:

— Cellsystem

— Kalibreringsinformation för mätanordningar som används för att mäta cellviabilitet (t.ex. spektrofotometer).

▼B

— Fullständiga underbyggande uppgifter om den specifika hudmodell som används, inbegripet validitet.

— Detaljerade uppgifter om försöksförfarandet.

— Testdoser

— Beskrivning av eventuella modifieringar av försöksförfarandet.

— Hänvisning till historiska uppgifter om modellen.

— Beskrivning av utvärderingskriterier.

Resultat:

— Data i tabellform för enskilda testprover.

— Beskrivning av övriga observerade effekter.

Diskussion av resultaten.

Slutsats.

4. **HÄNVISNINGAR**

1. OECD (2001), Harmonised Integrated Classification System for Human Health and Environmental Hazards of Chemical Substances and Mixtures. OECD Series on Testing and Assessment Number 33. ENV/JM/MONO(2001)6, Paris. http://www.olis.oecd.org/olis/2001doc.nsf/LinkTo/env-jm-mono(2001)6.

2. Testmetod B.4. Akut toxicitet: hudirriation/hudkorrosion.

3. 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., and Balls, M. (1995), A prevalidation study on *in vitro* skin corrosivity testing. The report recommendations of ECVAM Workshop 6 ATLA 23, s. 219–255.

4. Barratt, M.D., Brantom, P.G., Fentem, J.H., Gerner, I., Walker, A.P., and 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, s. 471–482.

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

6. OECD (1996), Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods, 62pp.

7. 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., and Zucco, F. (1995), Practical aspects of the validation of toxicity test procedures. Test report and recommendations of ECVAM workshops. ATLA 23, s. 129–147.

8. 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. http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/guidelines/validate.pdf.

▼B

9. Liebsch, M., Traue, D., Barrabas, C., Spielmann, H., Uphill, P., Wilkins, S., McPherson, J.P., Wiemann, C., Kaufmann, T., Remmele, M. and Holzhutter, H.G. (2000), The ECVAM prevalidation study on the use of EpiDerm for skin Corrosivity testing. ATLA 28, pp., s. 371–401.

10. ECVAM (1998), ECVAM News & Views. ATLA 26, s. 275–280.

11. ECVAM (2000), ECVAM News & Views. ATLA 28, s. 365–67.

12. ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods), (2002), ICCVAM evaluation of EpiDerm™, EPISKIN™ (EPI-200), 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. http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/epiddocs/epis_brd.pdf.

13. OECD (2002), Extended Expert Consultation Meeting on The In Vitro Skin Corrosion Test Guideline Proposal, Berlin, 1st — 2nd November 2001, Secretariat's Final Summary Report, 27th March 2002, OECD ENV/EHS, available upon request from the Secretariat

14. Worth AP, Fentem JH, Balls M, Botham PA, Curren RD, Earl LK, Esdaile DJ, Liebsch M (1998). An Evaluation of the Proposed OECD Testing Strategy for Skin Corrosion. ATLA 26: 709-720.

15. Mosmann, T. (1983), Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity asssays. J.Immunol. Meth. 65, s. 55–63.

16. Cannon, C.L., Neal, P.J., Southee, J.A., Kubilus, J., and Klausner, M., (1994), New epidermal model for dermal irritancy testing. Toxic. In Vitro 8, s. 889–891.

17. Ponec, M., Boelsma, E., Weerheim, A., Mulder, A., Boutwstra, J., and Mommaas, M., (2000), Lipid and ultrastructural characterization of reconstructed skin models. International Journal of Pharmaceutics. s. 203, 211–225.

18. Tinois E, Gaetani Q, Gayraud B, Dupont D, Rougier A, Pouradier DX (1994), The Episkin model: Successful reconstruction of human epidermis in vitro. In In vitro Skin Toxicology. Edited by A Rougier, AM Goldberg and HI Maibach: s. 133–140

19. Tinois E, Tiollier J, Gaucherand M, Dumas H, Tardy M, 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. Experimental Cell Research 193:310-319

20. Parentau, N.L., Bilbo, P., Molte, C.J., Mason, V.S., and Rosenberg, H. (1992), The organotypic culture of human skin keratinocytes and fibroblasts to achieve form and function. Cytotechnology 9, s. 163–171.

21. Wilkins, L.M., Watson, S.R., Prosky, S.J., Meunier, S.F., Parentau, N.L. (1994), Development of a bilayered living skin construct for clinical applications. Biotechnology and Bioengineering 43/8, s. 747–756.

▼B

22. Marshall, N.J., Goodwin, C.J., Holt, S.J. (1995), A critical assessment of the use of microculture tetrazolium assays to measure cell growth and function. Growth Regulation 5, s. 69–84.

23. Fentem, J.H., Briggs, D., Chesne, C., Elliot, G.R., Harbell, J.W., Heylings, J.R., Portes, P., Rouget, R., and van de Sandt, J.J.M., and Botham, P.A. (2001), A prevalidation study on *in vitro* tests for acute skin irritation: results and evaluation by the Management Team. Toxic. InVitro 15, s. 57–93.

▼B

B.41 3T3 NRU-FOTOTOXICITETSTEST *IN VITRO*

1. METOD

Denna testmetod motsvarar OECD TG 432 (2004).

1.1 INLEDNING

Fototoxicitet definieras såsom toxisk respons som framkallas när ett ämne appliceras på kroppen och responsen sedan antingen utlöses eller ökar (tydligt vid låga dosnivåer) efter exponering för ljus eller toxisk respons som framkallas genom hudbestrålning efter administrering av en kemikalie till organismen.

3T3 NRU-fototoxicitetstestet *in vitro* används för att identifiera den fototoxiska potentialen hos ett testämne vilken induceras av den exciterade kemikalien efter exponering för ljus. Testet ger en utvärdering av foto-cytotoxiciteten genom att mäta den relativa minskningen av viabilitet hos celler som exponeras för kemikalien i närvaro respektive i frånvaro av ljus. Ämnen som identifieras med detta test är sannolikt fototoxiska *in vivo* efter administrering till organismen och fördelning i huden eller efter applicering på hudens yta.

Många typer av kemikalier har rapporterats ge upphov till fototoxiska effekter (1)(2)(3)(4). Deras gemensamma egenskap är förmågan att absorbera ljusenergi inom solljusets våglängdsområde. Enligt fotokemins första lag (Grotthaus-Drapers lag) är tillräcklig absorption av ljuskvanta förutsättningen för en fotoreaktion. Innan man planerar biologisk testning av en kemikalie bör man därför fastställa den berörda kemikaliens absorptionsspektrum avseende UV/synligt ljus enligt OECD:s testriktlinjer 101. Om den molära extinktions- eller absorptionskoefficienten ligger under 10 liter × mol-$^{-1}$ × cm-1 har kemikalien troligen ingen fotoreaktiv potential och behöver sannolikt inte testas med 3T3 NRU-fototoxicitetstest *in vitro* eller annat biologiskt test av skadliga fotokemiska effekter (1)(5) (bilaga 1).

3T3 NRU-fototoxicitetstest *in vitro* utvärderades nyligen med avseende på tillförlitlighet och relevans (6)(7)(8)(9). 3T3 NRU-fototoxicitetstestet *in vitro* visades ha förutsägbarhet vad gäller akuta fototoxiska effekter på djur och människa *in vivo.* Testet är inte utformat för att förutsäga andra skadliga verkningar som kan uppstå genom kombinerad verkan av en kemikalie och ljus, t.ex. fotogenotoxicitet, fotoallergi eller fotokarcinogenitet. Testet är inte heller avsett att användas för bedömning av fototoxisk potential. Det har inte heller utformats för att förutsäga indirekta mekanismer kopplade till fototoxicitet, effekter av metaboliter av testämnet eller effekten av blandningar.

Metaboliserande system är ett allmänt krav för alla *in vitro-test* som används för förutsägelse av genotoxisk och karcinogen potential, men när det gäller fototoxicitet finns hittills bara några få exempel när metabolisk omvandling krävs för att ett fototoxin ska verka *in vivo* eller *in vitro.* Det är därför varken nödvändigt eller vetenskapligt motiverat att det aktuella testet genomförs med ett system som har metabolisk aktivering.

▼B

1.2 DEFINITIONER

strålning: Intensiteten hos ultraviolett (UV) eller synligt ljus som når en yta, uttryckt i W/m^2 eller mW/cm^2.

ljusdos: Den mängd (= intensitet x tid) ultraviolett (UV) eller synlig strålning som når en yta, uttryckt i Joule (= W x s) per ytenhet, t.ex. J/m^2 eller J/cm^2.

uv-ljusets våglängdsområde: Den uppdelning som rekommenderas av CIE (Commission Internationale de L'Eclairage) är: UVA (315-400 nm), UVB (280-315 nm) och UVC (100-280 nm). Även andra uppdelningar förekommer – gränsen mellan UVB och UVA sätts ofta vid 320 nm och UVA kan uppdelas i UV-A1 och UV-A2 med en gräns vid cirka 340 nm.

cellviabilitet: En parameter för att mäta en cellpopulations totala aktivitet (t.ex. upptag av det vitala färgämnet neutralrött i cellens lysosomer). Denna aktivitet korrelerar, beroende på den slutpunkt som uppmäts och den testutformning som används, med det totala antalet celler och deras vitalitet.

relativ cellviabilitet: Cellviabiliteten uttryckt i förhållande till negativa kontroller (med lösningsmedel) som har tagits fortlöpande under hela testförfarandet (+ UV eller – UV), utan behandling med testkemikalie.

PIF*(fotoirritationsfaktor):* En faktor som fås genom jämförelse mellan två cytotoxiska koncentrationer (EC_{50}) av testkemikalien som ger samma effekt i frånvaro (- UV) respektive närvaro (+ UV) av icke-cytotoxisk bestrålning med UVA/synligt ljus.

EC_{50}: Den koncentration av testkemikalien som minskar cellviabiliteten med 50 %.

MPE(Mean Photo Effect): Ett mått som har härletts från matematisk analys av de koncentrations-responskurvor som erhålls i frånvaro (- UV) respektive närvaro (+ UV) av icke-cytotoxisk bestrålning med UVA/synligt ljus.

fototoxicitet: Akut toxisk respons som framkallas när huden först exponeras för vissa kemikalier och därefter för ljus, eller som framkallas på liknande sätt genom hudbestrålning efter administrering av en kemikalie till organismen.

1.3 PRINCIP FÖR TESTMETODEN

3T3 NRU-fototoxicitetstestet *in vitro* bygger på en jämförelse av en kemikalies toxicitet då den testas i närvaro och i frånvaro av en icke-cytotoxisk dos av simulerat solljus. Cytotoxiciteten i detta test uttrycks som en koncentrationsberoende minskning av upptaget av det vitala färgämnet neutralrött vid mätning 24 timmar efter behandling med testkemikalien och påföljande bestrålning (10). Neutralrött är ett svagt katjoniskt färgämne som lätt tränger igenom cellmembranen genom icke-diffusion och ackumuleras intracellulärt i lysosomer. Förändringar i ytan av det känsliga lysosommembranet gör lysosomerna sköra och ger andra förändringar som gradvis blir irreversibla. Sådana förändringar orsakade av verkan av xenobiotika ger minskat upptag och minskad bindning av neutralrött. Därmed går det att skilja mellan viabla, skadade och döda celler, vilket är grunden för detta test.

▼B

Balb/c 3T3-celler hålls i kultur under 24 timmar för monolayerbildning. Två 96-hålsplattor per testkemikalie förinkuberas i en timme med åtta olika koncentrationer av testämnet. Därefter exponeras den ena av de två plattorna för en icke-cytotoxisk ljusdos medan den andra plattan hålls i mörker. Sedan byter man ut båda plattornas behandlingsmedium mot kulturmedium och efter ytterligare 24 timmars inkubering bestäms cellviabiliteten med neutralröttupptag. Cellviabiliteten uttrycks som en procentandel jämfört med obehandlade kontroller med lösningsmedel och beräknas för varje testkoncentration. Därefter uppskattas den fototoxiska potentialen genom jämförelse av den koncentrationsrespons som erhålls i närvaro och i frånvaro av strålning, i regel på nivån EC_{50}, dvs. den koncentration som minskar cellviabiliteten med 50 % jämfört med de obehandlade kontrollproverna.

1.4 BESKRIVNING AV TESTMETODEN

1.4.1 **Förberedelser**

1.4.1.1 *Celler*

En etablerad musfibroblastcellinje, Balb/c 3T3, klon 31, antingen från ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) eller från ECACC (European Collection of Cell Cultures, Salisbury, Wiltshire, UK) användes för valideringsstudien, och det rekommenderas därför att sådana celler erhålls från en välrenommerad cellbank. Andra celler eller cellinjer kan användas med samma testförfarande, förutsatt att odlingsbetingelserna anpassas till cellernas specifika behov, men motsvarigheten måste demonstreras.

Cellerna ska regelbundet kontrolleras med avseende på mykoplasmaförorening och får endast användas om ingen sådan påvisas (11).

Det är viktigt att Balb/c 3T3-cellernas UV-känslighet kontrolleras regelbundet enligt det kvalitetskontrollförfarande som beskrivs i denna metod. Eftersom cellernas UVA-känslighet kan öka med antalet passager ska Balb/c 3T3-celler med lägsta möjliga passagenummer användas, helst under 100 (se avsnitt 1.4.2.2.2 och bilaga 2).

1.4.1.2 *Media och odlingsbetingelser*

Lämpliga näringslösningar och inkuberingsbetingelser bör användas för vanliga cellpassager och under testförfarandet. För Balb/c 3T3-celler innebär detta t.ex. DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) kompletterat med 10 % serum från nyfödd kalv, 4 mM glutamin, penicillin (100 IE) och streptomycin (100 µg/ml) samt inkubering i fuktig atmosfär vid 37 °C och 5–7,5 % CO_2 beroende på bufferten (se avsnitt 1.4.1.4, andra stycket.). Det är särskilt viktigt att man med cellodlingsbetingelserna kan säkerställa en cellcykeltid inom det normala historiska intervallet för de celler eller den cellinje som används.

1.4.1.3 *Beredning av kulturer*

Celler från djupfrysta stamkulturer sås ut i näringslösningen i lämplig täthet och subkultiveras minst en gång innan de används i 3T3 NRU-fototoxicitetstestet *in vitro.*

▼B

För fototoxicitetstestet sås testcellerna ut i näringslösningen med sådan täthet att odlingarna inte växer samman före avslutat test, dvs. när cellviabiliteten bestäms 48 timmar efter utsådden. För Balb/c 3T3-celler som odlas på 96-hålsplattor rekommenderas tätheten 1×10^4 celler per hål.

För varje testkemikalie sås celler ut på samma sätt på två separata 96-hålsplattor som därefter parallellt används genom hela testförfarandet under identiska odlingsförhållanden, med undantag av den tidsperiod då den ena plattan bestrålas (+ UVA/synligt ljus) och den andra hålls i mörker (– UVA/synligt ljus).

1.4.1.4 *Beredning av testämne*

Testämnena måste ha beretts omedelbart före användningen, om man inte med stöd av stabilitetsdata kan visa att ämnena är lagringsbeständiga. Det rekommenderas att alla hantering och inledande behandling av cellerna görs under ljusbetingelser som inte kan ge fotoaktivering eller nedbrytning av testämnet före bestrålning.

Testkemikalierna ska lösas upp i buffrade saltlösningar, t.ex. EBSS (Earle's Balanced Salt Solution) eller fysiologiskt balanserade buffertlösningar som inte får innehålla proteinkomponenter, ljusaborberande komponenter (t.ex. pH-indikatorfärger och vitaminer) som kan störa bestrålningsresultatet. Eftersom cellerna under bestrålningen hålls utanför CO_2-inkubatorn under cirka 50 minuter, är det viktigt att undvika alkalisering. Om svaga buffertar som EBSS används kan detta uppnås genom att cellerna inkuberas vid 7,5 % CO_2. Om cellerna inkuberas vid endast 5 % CO_2 bör en starkare buffert väljas.

Testkemikalier med begränsad vattenlöslighet ska lösas upp i lämpligt lösningsmedel. Om lösningsmedel används måste detta förekomma i en konstant volymkoncentration i alla odlingar, dvs. både i de negativa kontrollerna och i alla koncentrationer av testkemikalien, och lösningsmedlet måste vara icke-cytotoxiskt vid denna koncentration. Testkemikalierna bör väljas så att utfällning och grumling i lösningarna undviks.

Som lösningsmedel rekommenderas dimetylsulfoxid (DMSO) och etanol (ETOH). Andra lösningsmedel med låg cytotoxicitet kan vara lämpliga men måste före användning utvärderas med avseende på specifika egenskaper, t.ex. reaktionsbenägenhet med testkemikalien, dämpning av den fototoxiska verkan eller benägenhet att fånga upp radikaler och/eller kemisk stabilitet i lösningsmedlet.

Vortex-blandning och/eller ultraljudsbehandling och/eller uppvärmning till lämplig temperatur kan användas för att underlätta upplösningen, förutsatt att detta inte påverkar testkemikaliens stabilitet.

▼B

1.4.1.5 *Bestrålningsbetingelser*

1.4.1.5.1 Ljuskälla

Valet av lämplig ljuskälla i kombination med lämplig filtrering är den viktigaste faktorn vid testning av fototoxicitet. I regel förknippas UVA och de synliga våglängdsområdena med fototoxiska reaktioner *in vivo* (3)(12), medan UVB har mindre relevans men är mycket cytotoxisk – cytotoxiciteten ökar 1 000-faldigt när våglängden minskar från 313 till 280 nm (13). Kriterierna för val av lämplig ljuskälla måste inbegripa kravet att ljuskällan emitterar våglängder som absorberas av testkemikalien (absorptionsspektrum) och att ljusdosen (den dos som uppnås inom skälig tid) är tillräcklig för detektion av kända fotocytotoxiska kemikalier. Dessutom får de våglängder och doser som används inte vara otillbörligt skadliga för testsystemet, vilket inbegriper värmeemission (infraröda området).

Det optimala är att använda simulerat solljus från en solsimulator. Fördelningen av stråldosen från den filterförsedda solsimulatorn ska vara nära den i utomhusljus som ges i (14). I solsimulatorer används både xenonbåglampor och (dopade) kvicksilver-metallhalidbåglampor (15). Fördelen med de senare är att de emitterar mindre värme och är billigare, men ljusets likhet med solljus är mindre än för xenonbåglampor. Eftersom alla solsimulatorer emitterar betydande mängder UVB bör de förses med lämpliga filter för att minska de mycket cytotoxiska UVB-våglängderna. Alla plastmaterial för cellodling innehåller UV-stabilisatorer. Därför bör spektret mätas genom samma typ av lock till 96-hålsplattor som de som används vid bestämningen. Oavsett vilka åtgärder som vidtas för att dämpa delar av spektret genom filtrering eller genom ofrånkomlig inverkan från utrustningen får det spektrum som registreras under filtren inte avvika från standardiserat utomhusdagsljus (14). Ett exempel på bestrålningsfördelning för den filterförsedda solsimulator som användes i valideringsstudien av 3T3-NRU-fototoxicitetstestet *in vitro* ges i (8)(16). Se även figur 1 i bilaga 2.

1.4.1.5.2 Dosimetri

Ljusets (strålningens) intensitet ska före varje fototoxicitetstest rutinmässigt kontrolleras med hjälp av en lämplig bredbands-UV-mätare. Intensiteten ska mätas genom samma typ av lock som används för de 96-hålsplattor som används för toxicitetsbestämningen. UV-mätaren måste ha kalibrerats mot källan och dess prestanda bör kontrolleras. För detta ändamål rekommenderas användning av en referensmätare, dvs. en annan, identiskt kalibrerad UV-mätare av samma typ. Helst ska man även då och då använda en spektroradiometer för att mäta den spektrala strålningen från den filtrerade ljuskällan och för att kontrollera bredbands-UV-mätarens kalibrering.

En dos på 5 J/cm^2 (UVA) fastställdes vara icke-toxisk för Balb/c 3T3-celler men tillräckligt stark för att excitera kemikalier så att de utlöste fototoxiska reaktioner (6)(17). För att erhålla 5 J/cm^2 inom 50 minuter ställdes t.ex. strålningen in på 1,7 mW/cm^2 (figur 2, bilaga 2). Om en annan cellinje eller en annan ljuskälla används måste strålningsdosen eventuellt justeras så att en dosregim kan väljas som inte är skadlig för cellerna men som räcker för att excitera vanliga fototoxiska ämnen. Tiden för ljusexponeringen beräknas på följande sätt:

▼B

$$t(\text{min}) = \frac{\text{bestrålningsdos } (J/cm^2) \times 1000}{\text{bestrålning } (mW/cm^2) \times 60} \qquad (1J = 1\ Ws)$$

1.4.2 *Försöksförhållanden*

1.4.2.1 *Koncentrationer av testämne*

Koncentrationsområdena för en kemikalie som ska testas i närvaro (+ UVA) och i frånvaro (– UVA) av ljus ska först fastställas på lämpligt sätt i förberedande försök. Det kan vara lämpligt att testa lösligheten initialt och efter 60 minuter (eller den behandlingstid som ska användas) eftersom lösligheten kan förändras med tiden eller under loppet av exponeringen. För att undvika toxicitet på grund av olämpliga kulturbetingelser eller på grund av starkt sura eller basiska kemikalier ska pH för cellkulturerna med tillsatt testkemikalie ligga i området 6,5–7,8.

Den högsta koncentrationen av testämne bör ligga inom fysiologiska testbetingelser, dvs. så att osmotisk stress och pH-stress undviks. Beroende på testkemikalien kan det vara nödvändigt att beakta andra fysikalkemiska egenskaper som faktorer som begränsar den högsta testkoncentrationen. För relativt svårlösliga ämnen som inte är toxiska vid koncentrationer upp till mättnadspunkten ska den högsta möjliga koncentrationen testas. I regel ska utfällning av testkemikalien vid någon testkoncentration undvikas. Den maximala koncentrationen av ett testämne ska inte överstiga 1 000 μg/ml och osmolariteten ska inte överstiga 10 mmolar. En geometrisk spädningsserie med 8 testämneskoncentrationer och konstant utspädningsfaktor ska användas (se avsnitt 2.1, andra stycket).

Om information finns (från ett försök för att fastställa koncentrationsområde) om att testkemikalien inte är cytotoxisk upp till gränskoncentrationen i mörkerförsöket (– UVA) men är starkt cytotoxisk vid bestrålning (+ UVA) kan de koncentrationsområden som ska väljas för ljusförsöket (+ UVA) skilja sig från dem som har valts för mörkerförsöket för att kravet på adekvat datakvalitet ska uppfyllas.

1.4.2.2 *Kontroller*

1.4.2.2.1 Cellernas strålningskänslighet, fastställande av historiska data

Cellerna bör rutinmässigt (ungefär vid var femte passage) kontrolleras med avseende på känslighet för ljuskällan genom att deras viabilitet följs efter exponering för ökande stråldoser. Flera stråldoser, inbegripet nivåer betydligt över dem som används för 3T3 NRU-fototoxicitetstestet, ska användas för denna bestämning. Doserna kvantifieras lättast genom mätningar av ljuskällans UV-del. Cellerna sås med den täthet som används för 3T3 NRU-fototoxicitetstestet *in vitro* och bestrålas påföljande dag. Cellviabiliteten bestäms en dag senare med neutralröttupptag. Det ska visas att den resulterande högsta icke-cytotoxiska dosen (t.ex. vid 5 J/cm^2 (UVA) vid valideringsstudien) räckte för att klassificera referenskemikalierna (tabell 1) korrekt.

▼B

1.4.2.2.2 Strålningskänslighet, kontroll av det aktuella testet

Testet uppfyller kriterierna om de bestrålade negativkontrollerna med lösningsmedel uppvisar en viabilitet på över 80 % då de jämförs med obestrålade negativkontroller med lösningsmedel.

1.4.2.2.3 Lösningsmedelskontrollernas viabilitet

Den absoluta optiska densiteten (OD540 NRU) för neutralrött extraherat från lösningsmedelskontrollerna visar om de 1×10^4 cellerna som såtts per hål har tillvuxit med normal fördubblingstid under de två dagar bestämningen pågått. Ett test uppfyller godtagbarhetskriterierna om medelvärdet på OD540 NRU för de obehandlade kontrollerna är $\geq 0{,}4$ (dvs. cirka tjugo gånger bakgrundsabsorbansen för lösningsmedlet).

1.4.2.2.4 Positivkontroll

En känd fototoxisk kemikalie ska testas samtidigt med varje 3T3 NRU-fototoxicitetstest *in vitro*. Klorpromazin (CPZ) rekommenderas. Följande godtagbarhetskriterier definierades för test av CPZ enligt standardprotokollet för 3T3 NRU-fototoxicitetstestet *in vitro:* bestrålad CPZ (+ UVA): EC_{50} = 0,1 till 2,0 µg/ml, obestrålad CPZ (– UV): EC_{50}= 7,0 till 90,0 µg/ml. Fotoirritationsfaktorn (PIF) ska vara > 6. Historisk prestanda för positivkontrollen ska följas.

Andra fototoxiska kemikalier som är lämpliga med tanke på de testade kemikaliernas kemikalieklass eller löslighetsegenskaper kan användas som parallella positivkontroller i stället för klorpromazin.

1.4.3 **Testförfarande (6)(7)(8)(16)(17)**

1.4.3.1 *Dag 1*

Dosera 100 µl näringslösning i de perifera hålen i en 96-håls mikrotitterplatta för vävnadsodling (= blindprov). Dosera 100 µl cellsuspension med 1 x $l0^5$ celler/ml i näringslösning (= 1x104 celler/hål) i de återstående hålen. Två plattor ska beredas för varje serie av enskilda testämneskoncentrationer, för lösningsmedel och för positivkontroller.

Inkubera cellerna i 24 timmar (se avsnitt 1.4.1.2) tills de bildar ett halvkonfluent monolayer. Denna inkuberingsperiod är tillräcklig för cellernas återhämtning och vidhäftning samt exponentiell tillväxt.

1.4.3.2 *Dag 2*

Dekantera näringslösningen från cellerna efter inkuberingen och tvätta två gånger med 150 µl av den buffertlösning som används för inkuberingen. Tillsätt 100 µl av buffertlösningen med lämplig koncentration av testkemikalie eller lösningsmedel (lösningsmedelskontroll). Använd 8 olika koncentrationer av testkemikalien. Inkubera cellerna med testämnet i mörker i 60 minuter (se avsnitt 1.4.1.2 och 1.4.1.4, andra stycket).

Från de två plattor som beretts för varje koncentrationsserie av testämne och kontroll väljs en, i regel slumpmässigt, för bestämning av cytotoxicitet (– UVA) (dvs. kontrollplattan), och en (behandlingsplattan) för bestämning av fotocytotoxicitet (+ UVA).

▼B

Utför bestämningens + UVA-del genom att bestråla cellerna vid rumstemperatur i 50 minuter genom locket på 96-hålsplattan med den högsta icke-cytotoxiska stråldosen (se även bilaga 2). Håll obestrålade plattor (– UVA) i en mörk låda i 50 minuter (= UVA-exponeringstiden).

Dekantera testlösningen och tvätta två gånger med 150 µl av den buffertlösning som används för inkuberingen, men utan testämnet. Ersätt bufferten med näringslösning och inkubera (se avsnitt 1.4.1.2) över natt (18–22 timmar).

1.4.3.3 *Dag 3*

1.4.3.3.1 U t v ä r d e r i n g m e d m i k r o s k o p

Cellerna ska undersökas i faskontrastmikroskop med avseende på tillväxt, morfologi och monolayerintegritet. Förändringar av cellernas morfologi och effekter på celltillväxten ska noteras.

1.4.3.3.2 T e s t m e d u p p t a g n i n g a v n e u t r a l r ö t t

Tvätta cellerna med 150 µl föruppvärmd buffert. Avlägsna tvättlösningen genom att klappa försiktigt. Tillsätt 100 µl av 50 µg/ml neutralrött (NR) (3-amino-7-dimetylamino-2-metylfenazinhydroklorid, Einecs-nummer 209-035-8; CAS-nummer 553-24-2; C.I. 50040) i medium utan serum (16) och inkubera enligt beskrivningen i avsnitt 1.4.1.2 i tre timmar. Avlägsna NR-mediet efter inkuberingen och tvätta cellerna med 150 µl buffert. Dekantera och avlägsna överskottet av buffert genom absorption eller centrifugering.

Tillsätt exakt 150 µl NR-desorptionslösning (färsk lösning av 49 delar vatten + 50 delar etanol + 1 del ättiksyra).

Skaka mikrotiterplattan varsamt på en skakmaskin i 10 minuter tills NR har extraherats ur cellerna och en homogen lösning har bildats.

Mät NR-extraktets optiska densitet vid 540 nm i en spektrofotometer och använd blindproven som referens. Spara data i lämpligt filformat för efterföljande analys.

2. **DATA**

2.1 KVALITET OCH KVANTITET AV DATA

Erhållna testdata bör ge möjlighet till meningsfull analys av den koncentrationsberoende respons som konstaterats i närvaro och i frånvaro av bestrålning och om möjligt den koncentration av testkemikalien som minskar cellviabiliteten till 50 % (EC_{50}). Om cytotoxicitet detekteras ska både koncentrationsområdet och intervallet för enskilda koncentrationer anpassas så att försöksdata kan sammanställas till en kurva.

För både klart positiva och klart negativa resultat (se avsnitt 2.3, första stycket), kan det räcka med huvudförsöket, underbyggt med ett eller flera preliminära försök för bestämning av område.

▼B

Om man får testresultat som är oklara eller kommer nära förutsägbarhetsmodellens gräns måste resultaten verifieras genom upprepat test (se även avsnitt 2.4, andra stycket). I sådana fall bör man överväga att variera försöksbetingelserna. Försöksbetingelser som kan varieras inbegriper koncentrationsområdet eller koncentrationsintervallet, förinkuberingstiden och bestrålningstiden. En kortare exponeringstid kan vara lämplig för kemikalier som är instabila i vatten.

2.2 **UTVÄRDERING AV RESULTATEN**

En fotoirritationsfaktor (PIF) eller ett MPE-värde (Mean Photo Effect) kan beräknas för utvärderingen av data.

Beräkning av måtten på fototoxicitet (se nedan) kräver att de diskreta värdena för koncentrationsrespons uppskattas med hjälp av en lämplig fullständig koncentrations-responskurva (försöksmodell). Kurvanpassningen till data görs i regel med icke-linjär regression (18). För att bedöma datavariabilitetens inverkan på den anpassade kurvan rekommenderas bootstrap-metoden.

En fotoirritationsfaktor (PIF) beräknas med hjälp av följande formel:

$$PIF = \frac{EC_{50}(-UVA)}{EC_{50}(+UVA)}$$

Om inget värde på EC_{50} i närvaro eller frånvaro av ljus kan beräknas, går det inte att beräkna någon PIF för testämnet. MPE (Mean Photo Effect) bygger på en jämförelse mellan de fullständiga koncentrations-responskurvorna (19). MPE definieras som det viktade medelvärdet över en representativ uppsättning fotoeffektvärden:

$$MPE = \frac{\sum_{i=1}^{n} w_i PE_{c_i}}{\sum_{i=1}^{n} w_i}$$

Fotoeffekten PE_c vid koncentrationen C definieras som produkten av responseffekten RE_c och doseffekten DE_c dvs. $PE_c = RE_c$ x DE_c. Responseffekten RE_c är skillnaden mellan observerade respons i frånvaro och i närvaro av ljus, dvs. $RE_c = R_c$ (– UVA) $–R_c$ (+ UVA). Doseffekten ges av

$$DE_c = \left| \frac{C/C^* - 1}{C/C^* + 1} \right|$$

där C* representerar ekvivalenskoncentrationen, dvs. den koncentration där + UVA-responsen är lika stor som – UVA-responsen vid koncentrationen C. Om C* inte kan bestämmas därför att svarsvärdena på +UVA-kurvan systematiskt är högre eller lägre än R_C (– UVA) sätts doseffekten till 1. Viktningsfaktorerna w_i ges av det högsta responsvärdet, dvs. w_i = MAX {R_i (+ UVA), R_i (– UVA) }. Koncentrationsrastret C väljs så att samma antal punkter faller inom vart och ett av de koncentrationsintervall som definieras av de koncentrationsvärden som användes i försöket. Beräkningen av MPE begränsas till det maximala koncentrationsvärde vid vilket minst en av de två kurvorna ännu uppvisar ett responsvärde på minst 10 %. Om denna maximala koncentration är högre än den högsta koncentration som användes i + UVA-försöket sätts den återstående delen av + UVA-kurvan till responsvärdet ”0”. Beroende på om MPE-värdet är större än ett korrekt valt tröskelvärde (MPE_c=0,15) eller inte, klassificeras kemikalien som fototoxisk.

▼B

Ett programpaket för beräkning av PIF och MPE finns tillgängligt från (20).

2.3 TOLKNING AV RESULTATEN

Baserat på valideringsstudien (8) förutsäger PIF < 2 eller MPE < 0,1”ingen fototoxicitet”. PIF > 2 och <5 eller MPE > 0,1 och < 0,15 förutsäger ”sannolik fototoxicitet”. PIF > 5 eller MPE > 0,15 förutsäger ”fototoxicitet”.

Ett laboratorium som ska börja använda denna bestämningsmetod ska testa de referensmaterial som listas i tabell 1 innan man börjar testa ämnen för fototoxisk bestämning. PIF- eller MPE-värdena ska ligga nära dem som anges i tabell 1.

Tabell 1

Kemiskt namn	EINECS-nr	CAS-nr	PIF	MPE	Absorptions-topp	Lösningsmedel [1]
Amiodaron-HCl	243-293-2	[19774-82-4]	> 3,25	0,27–0,54	242 nm 300 nm (axel)	etanol
Kloropromazin-HCl	200-701-3	[69-09-0]	> 14,4	0,33–0,63	309 nm	etanol
Norfloxacin	274-614-4	[70458-96-7]	> 71,6	0,34–0,90	316nm	acetonitril
Antracen	204-371-1	[120-12-7]	> 18,5	0,19–0,81	356 nm	acetonitril
Protoporfyrin IX, Dinatrium	256-815-9	[50865-01-5]	>4 5,3	0,54–0,74	402 nm	etanol
L-Histidin		[7006-35-1]	no PIF	0,05–0,10	211nm	vatten
Hexaklorofen	200-733-8	[70-30-4]	1,1–1,7	0,00–0,05	299 nm 317nm (axel)	etanol
Natriumlauryl-sulfat	205-788-1	[151-21-3]	1,0–1,9	0,00–0,05	Ingen absorption	vatten

[1] Lösningsmedel som används vid absorptionsmätning.

2.4 TOLKNING AV DATA

Om fototoxisk verkan observeras endast vid den högsta testkoncentrationen (särskilt för vattenlösliga testkemikalier), kan ytterligare faktorer behöva beaktas för bestämning av skadligheten. Dessa faktorer kan inbegripa data om hudabsorption och ackumulering av kemikalien i huden och/eller data från andra test, t.ex. test av kemikalien på djur- eller människohud *in vitro* eller på hudmodeller.

▼B

Om ingen toxicitet påvisas (+ UVA och – UVA) och om dålig löslighet begränsade de koncentrationer som kunde testas bör testämnets lämplighet för bestämningsmetoden ifrågasättas och verifierande testning bör övervägas, t.ex. en annan modell.

3. **RAPPORTERING**

TESTRAPPORT

Testrapporten ska innehålla följande uppgifter:

Testämne:

— identifieringsdata, vanliga generiska namn och IUPAC- och CAS-nummer (i mån av tillgänglighet),

— fysikalisk form och renhetsgrad,

— fysikalisk-kemiska egenskaper av betydelse för studien,

— absorptionsspektrum för UV/synligt ljus,

— stabilitet och fotostabilitet (i mån av tillgänglighet).

Lösningsmedel:

— motivering av valet av lösningsmedel,

— testkemikaliens löslighet i det valda lösningsmedlet,

— procenthalten lösningsmedel i behandlingsmediet.

Celler:

— typ av celler och deras källa,

— frånvaron av mykoplasma,

— antalet cellpassager (i mån av tillgänglighet),

— cellernas strålningskänslighet, bestämd med den bestrålningsutrustning som använts för 3T3 NRU-fototoxicitetstestet *in vitro.*

Försöksförhållanden (1) – *inkubering före och efter behandlingen:*

— näringslösningens (kulturmediets) typ och sammansättning,

— inkuberingsförhållanden (CO_2-koncentration, temperatur, fuktighet),

— inkuberingens varaktighet (förbehandling, efterbehandling).

Försöksförhållanden (2) – *behandling med kemikalien:*

— motivering för valet av de koncentrationer som använts i närvaro och i frånvaro av bestrålning med ljus,

— om testkemikalien är begränsat löslig och om cytotoxicitet inte föreligger, motivering för den högsta koncentration som testats,

— typ och sammansättning hos behandlingsmediet (buffrad saltlösning),

— kemikaliebehandlingens varaktighet.

Försöksförhållanden (3) – *bestrålning:*

— motivering för valet av den ljuskälla som använts,

▼B

— tillverkare och typ av ljuskälla och radiometer,

— ljuskällans spektrala strålningsegenskaper,

— transmissions- och absorptionsegenskaper hos de filter som använts,

— radiometerns egenskaper och närmare uppgifter om kalibreringen,

— avstånd mellan ljuskälla och testsystem,

— UVA-bestrålning på detta avstånd, uttryckt i mW/cm^2,

— varaktigheten hos bestrålningen med UV/synligt ljus,

— UVA-dos (bestrålning x tid), uttryckt i J/cm^2,

— temperatur som använts för cellodlingarna under bestrålningen och för cellodlingar som parallellt hållits i mörker.

Försöksförhållanden (4) – *viabilitetstest med neutralrött (NR):*

— sammansättning hos NR-mediet,

— NR-inkuberingens varaktighet,

— inkuberingsförhållanden (CO_2-koncentration, temperatur, fuktighet),

— NR-extraktionsbetingelser (extraktionsmedel, varaktighet),

— våglängd som använts för spektrofotometrisk avläsning av optisk densitet för NR,

— annan våglängd (referens), om sådan har använts,

— spektrofotometerblindprovets innehåll, om blindprov har använts.

Resultat:

— cellviabilitet som erhållits vid varje koncentration av testkemikalien uttryckt som genomsnittlig procentandel jämfört med lösningsmedelskontrollernas viabilitet,

— koncentrations-responskurvor (testkemikaliekoncentration i förhållande till relativ cellviabilitet) som erhållits i parallella försök med + UVA och – UVA,

— analys av koncentrations-responskurvorna: om möjligt beräkning av EC_{50} (+ UVA) och EC_{50} (– UVA),

— jämförelse av de två koncentrations-responskurvorna som erhållits i närvaro och i frånvaro av bestrålning med UVA/synligt ljus, antingen genom beräkning av PIF (fotoirritationsfaktorn) eller genom beräkning av MPE (Mean-Photo-Effect)

— kriterier för godkännande av testet – parallell lösningsmedelskontroll:

— absolut viabilitet (optisk densitet hos neutralröttsextraktet) hos bestrålade och obestrålade celler,

— historiska data för negativ- och lösningsmedelskontroll – medelvärde och standardavvikelse,

— kriterier för godkännande av testet – parallell positivkontroll:

▼B

— EC_{50}(+ UVA) och EC_{50}(– UVA) och PIF/MPE för positivkontrollkemikalie,

— historiska data för positivkontrollkemikalie: EC50 (+ UVA) och EC_{50} (– UVA) och PIF/MPE, medelvärde och standardavvikelse.

Diskussion av resultaten.

Slutsatser.

4. **HÄNVISNINGAR**

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., Döring, B., Holzhütter, 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., Holzhütter, 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 *In 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 photographic colour films and paper prints – Methods for measuring image stability.

15. Sunscreen Testing (UV.B) TECHNICAL REPORT, 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.

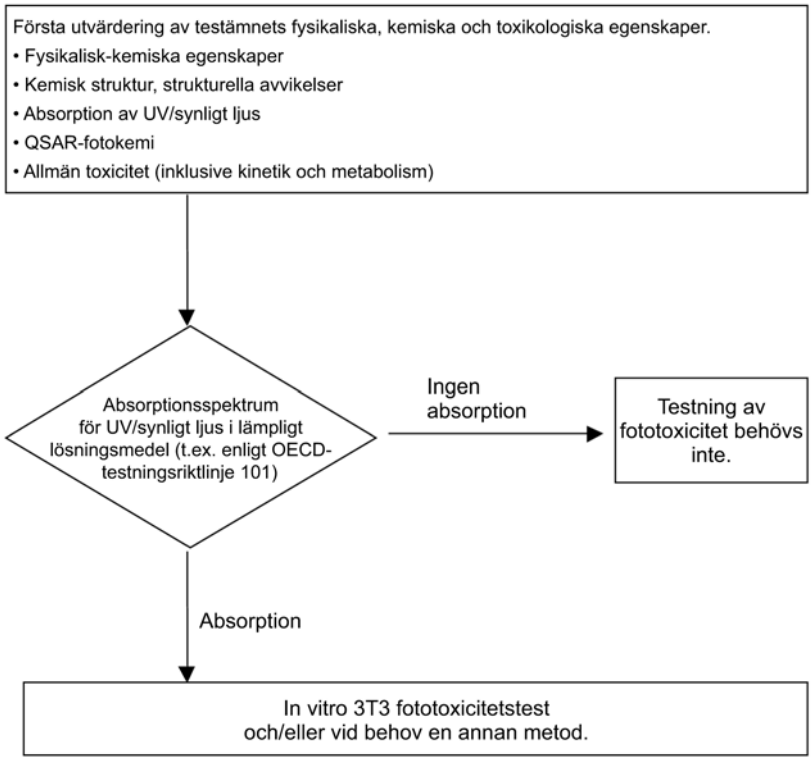
19. Holzhütter, H.G. (1997). A general measure of *in vitro* phototoxicity derived from pairs of dose-response curves and its use for predicting the *in vivo* phototoxicity of chemicals. ATLA, 25, 445–462.

20. http://www.oecd.org/document/55/0,2340,en_2649_34377_2349687_1_1_1_1,00.html

▼B

Bilaga 1

Rollen för 3T3 NRU-fototoxicitetstest vid ett sekventiellt tillvägagångssätt för fototoxicitetstestning av kemikalier

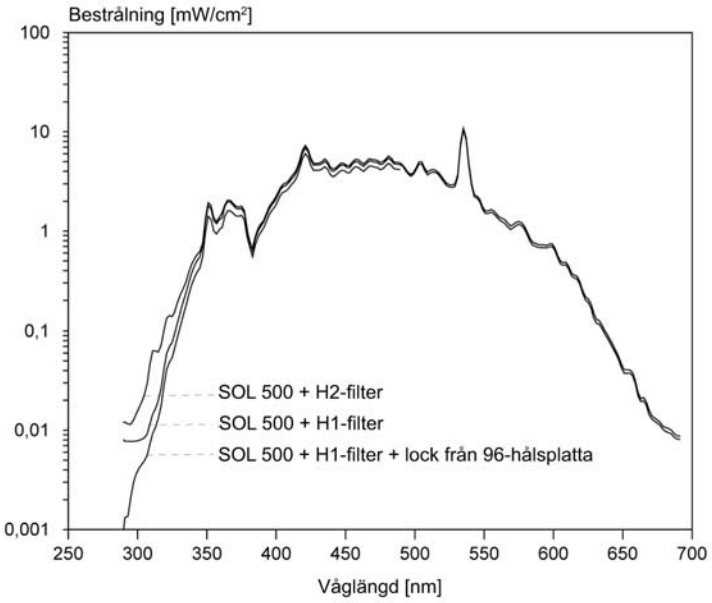


▼B

Bilaga 2

Figur 1

Spektral strålningsdistribution från en filtrerad solsimulator



(se avsnitt 1.4.1.5, andra stycket)

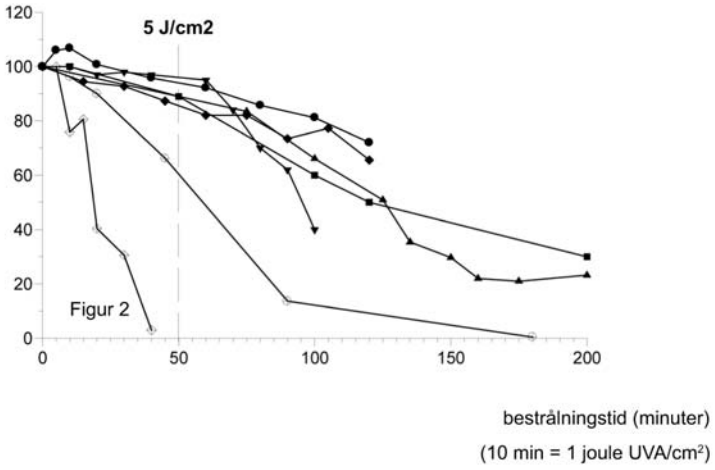
Figur 1 ger ett exempel på en godtagbar strålningsdistribution för en filtrerad solsimulator. Värdena kommer från den dopade metallhalidkälla som användes i valideringsstudien för 3T3 NRU-fototoxicitetstest (6)(8)(17). Effekten av två olika filter och den ytterligare filtreringsverkan från locket på 96-hålsplattan visas. H2-filtret användes endast med testsystem som tål en större mängd UVB (test med hudmodell och fotohemolystest med röda blodkroppar). I 3T3 NRU-fototoxicitetstestet användes H1-filtret. Figuren visar den ytterligare filtreringsverkan som plattlocket ger, huvudsakligen i UVB-området, som dock fortfarande lämnar tillräckligt med UVB i strålningsspektret för att excitera kemikalier som normalt absorberar i UVB-området, t.ex. amiodaron (se tabell 1).

▼B

Figur 2

Strålningskänslighet hos Balb/c 3T3-celler (mätt i UVA-området)

Cellviabilitet (% NR-upptag hos mörkerkontroller)



bestrålningstid (minuter)

(10 min = 1 joule UVA/cm^2)

(se avsnitt 1.4.1.5.2, andra stycket, 1.4.2.2.1, 1.4.2.2.2)

Känslighet hos Balb/c 3T3-celler mot bestrålning med den solsimulator som användes i valideringsstudien av 3T3 NRU-fototoxicitetstestet, mätt i UVA-området. Figuren visar resultat erhållna på 7 olika laboratorier vid förvalideringsstudien (1). De två kurvorna med öppna symboler erhölls med åldrade celler (stort antal passager) som man hade varit tvungen att ersätta med nya celler. Kurvorna med symboler i fetstil visar celler med godtagbar strålningstolerans.

Den högsta icke-cytotoxiska stråldosen på 5 J/cm^2 erhölls från dessa data (vertikal streckad linje). Den horisontella streckade linjen visar dessutom den maximala godtagbara strålningseffekten som ges i stycke 1.4.2.2.

▼M3

B.42. **HUDSENSIBILISERING: LLNA-METODEN (LOCAL LYMPH NODE ASSAY)**

INLEDNING

1. OECD:s riktlinjer för testning av kemikalier (OECD Guidelines for the Testing of Chemicals) och EU:s testmetoder baserade på dem ses regelbundet över med hänsyn till den vetenskapliga utvecklingen, nya lagstiftningsbehov och djurens välbefinnande. Den ursprungliga testmetoden för bestämning av hudsensibilisering hos möss, LLNA-metoden (OECD:s testriktlinje 429, kapitel B.42 i denna bilaga), har antagits tidigare (1). Närmare uppgifter om valideringen av LLNA-metoden och en granskning av arbetet i samband med denna har offentliggjorts (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11). Den uppdaterade LLNA-metoden grundar sig på utvärderingen av experimentella och vetenskapliga uppgifter (12). Detta är den andra testmetoden som tas fram för bedömning av kemikaliers (ämnens och blandningars) potential att framkalla hudsensibilisering hos djur. Den gamla testmetoden (dvs. OECD:s testriktlinje 406, kapitel B.6 i denna bilaga) omfattar test på marsvin, särskilt maximeringstest på marsvin och Buehler-test (13). Jämfört med B.6 och OECD:s testriktlinje 406 (13) har LLNA fördelar när det gäller djurens välbefinnande. Den uppdaterade LLNA-testmetoden omfattar en uppsättning prestandastandarder (tillägg 1) som kan användas för att utvärdera valideringsstatus för nya och/eller modifierade testmetoder som är funktionellt och mekaniskt likartade med LLNA, enligt principerna i OECD:s riktlinjedokument nr 34 (14).

2. LLNA används för att undersöka hudsensibiliseringens induktionsfas, vilket ger tillgång till kvantitativa data som är lämpliga för dos–responsbedömning. Här bör noteras att de ämnen som har milda till moderata sensibiliseringsegenskaper och som anses vara lämpliga som positivt kontrollämne för testmetoder med marsvin (dvs. B.6, OECD:s testriktlinje 406) (13), även är lämpliga för LLNA-metoden (6) (8) (15). Inom denna testmetod beskrivs också en variant som kallas reducerat LLNA-test (rLLNA), med upp till 40 procent färre djur (16) (17) (18). Denna variant kan användas när det finns lagstiftade krav på att bekräfta negativ förutsägelse för hudsensibiliserande potential, förutsatt att alla andra LLNA-protokollspecifikationer följs enligt beskrivningen av denna testmetod. Förutsägelsen av negativt resultat ska bygga på tillgänglig information enligt beskrivningen i punkt 4. För tillämpning av rLLNA krävs klara motiveringar och vetenskapliga belägg. Om det mot förmodan uppstår positiva eller tvetydiga resultat med rLLNA kan det krävas ytterligare testning för att tolka eller förtydliga resultaten. Varianten rLLNA bör inte användas för faroidentifiering av hudsensibiliserande testämnen i fall där dos–responsinformation behövs, t.ex. vid underklassificering för förordning (EG) nr 1272/2008 om klassificering, märkning och förpackning av ämnen och blandningar och Förenta nationernas globalt harmoniserade system för klassificering och märkning av kemikalier.

DEFINITIONER

3. Definitioner av begreppen finns i tillägg 2.

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN OCH BEGRÄNSNINGAR

4. LLNA är en alternativ metod för identifiering av hudsensibiliserande kemikalier. Detta betyder dock inte nödvändigtvis att LLNA alltid ska användas i stället för test på marsvin (dvs. B.6; OECD:s testriktlinje 406) (13), utan att LLNA-metoden är likvärdig och kan användas som ett alternativ i fall där positiva och negativa resultat i regel inte kräver någon ytterligare bekräftelse. Testningslaboratoriet bör analysera all tillgänglig information om testämnet innan själva testningen genomförs. Denna information omfattar

▼M3

ämnets identitet och kemiska struktur, fysikalisk-kemiska egenskaper, resultaten från andra eventuella *in vitro*- eller *in vivo*-test avseende toxicitet samt toxikologiska data om strukturellt närbesläktade kemikalier. Med stöd av denna information bör man överväga om LLNA-metoden är lämplig för ämnet (med tanke på att metoden inte kan användas för vissa typer av kemikalier, se punkt 5) och använda informationen som hjälp vid valet av dos.

5. LLNA är en *in vivo*-metod, och av detta följer att man måste använda djur för att bedöma sensibilisering genom allergisk kontakt. Metoden ger dock möjligheter att minska antalet djur. Dessutom ger LLNA möjlighet till bättre behandling av djuren (mindre smärta och lidande) vid test avseende sensibilisering genom allergisk kontakt. LLNA baserar sig på observationer av immunologiska händelser som stimuleras av kemikalier under sensibiliseringens induktionsfas. Till skillnad från test på marsvin (dvs. B.6; OECD:s testriktlinje 406) (13) kräver LLNA inte framkallning av provokationsinducerade dermala hypersensitivitetsreaktioner. Dessutom behöver adjuvant inte användas, vilket är fallet vid maximeringstest på marsvin (13). LLNA är därför en mindre plågsam metod för djuren. Trots LLNA-metodens fördelar jämfört med B.6 och OECD:s testriktlinje 406 bör man vara medveten om att LLNA har vissa begränsningar. Det kan därför i vissa fall vara nödvändigt att använda B.6 eller OECD:s testriktlinje 406 (13) (t.ex. falska negativa fynd med LLNA för vissa metaller eller falska positiva fynd för vissa hudirriterande ämnen [såsom vissa ytaktiva kemikalier] (19) (20) eller testämnets löslighet). Därutöver gäller att kemiska klasser eller ämnen vars funktionella grupper har påvisats agera som potentiella störfaktorer (21) kan göra det nödvändigt att använda test på marsvin (dvs. B.6; OECD:s testriktlinje 406) (13). På grund av den begränsade valideringsdatabasen, som primärt bestod av växtskyddsmedelsformuleringar, är det mer sannolikt att LLNA i jämförelse med test på marsvin ger positivt resultat för dessa typer av testämnen (22). Vid testning av formuleringar kan man dock överväga att även använda liknande ämnen med kända resultat som referensämnen för att påvisa att LLNA-metoden fungerar tillfredsställande (se punkt 16). När dessa identifierade begränsningar räknas bort bör LLNA gå att använda för testning av alla ämnen, utom om ett ämne förknippas med egenskaper som kan påverka LLNA-metodens exakthet.

PRINCIP FÖR TESTMETODEN

6. LLNA bygger på principen om att sensibiliserande ämnen inducerar en primär proliferation av lymfocyter i de lymfnoder som dränerar det område där testämnet appliceras. Denna proliferation står i proportion till den applicerade dosen och det allergiframkallande ämnets styrka, och är ett enkelt sätt att få en kvantitativ mätning av sensibiliseringen. Proliferationen mäts genom att jämföra medelproliferationen i varje testgrupp med medelproliferationen i den vehikelbehandlade kontrollgruppen. Förhållandet mellan medelproliferationen i respektive behandlingsgrupp och den parallella vehikelkontrollgruppen, kallat stimulationsindex (SI), bestäms och detta bör vara $\geq$ 3 för att det ska vara motiverat att klassificera testämnet som potentiellt hudsensibiliserande ämne. De förfaranden som beskrivs här grundar sig på radioaktiv märkning *in vivo* för mätning av ett ökat antal prolifererande celler i de aurikulära dränerande lymfnoderna. Det går dock också att använda andra slutpunkter för bedömning av antalet prolifererande celler, förutsatt att kraven enligt prestandastandarderna uppfylls till fullo (tillägg 1).

▼M3

TESTBESKRIVNING

Val av djurart

7. För detta test används mus. I testet används unga vuxna mushonor av stammen CBA/Cirka eller CBA/J som inte har fått ungar och som inte är dräktiga. När försöket inleds bör djuren vara 8–12 veckor gamla. Djurens viktvariation bör vara minimal och får inte överskrida 20 % av medelvikten. Övriga stammar eller hanar kan användas som alternativ förutsatt att det finns tillräckliga data som stöd för att det inte förekommer några betydande stam- eller könsberoende skillnader i LLNA-respons.

Inhysnings- och utfodringsförhållanden

8. Mössen ska inhysas i grupper (23), utom om det finns tillbörlig vetenskaplig motivering för individuell inhysning. Temperaturen i testdjurens utrymmen bör vara 22 ± 3 °C. Den relativa fuktigheten bör vara minst 30 % och ska helst inte överstiga 70 %, utom när rummet rengörs. Målvärdet bör dock vara 50–60 %. Belysningen bör vara artificiell med omväxlande 12 timmar ljus och 12 timmar mörker. För utfodringen kan konventionellt laboratoriefoder användas och djuren bör ha obegränsad tillgång till dricksvatten.

Förberedelse av djuren

9. Djuren väljs ut slumpmässigt och förses med märkning så att de kan identifieras individuellt (öronmärkning får dock inte användas). Därefter får djuren acklimatisera sig till laboratoriets betingelser i sina burar i minst fem dagar före doseringsstart. Innan behandlingen inleds undersöks alla djur för att säkerställa att de inte har synliga hudskador.

Beredning av doseringslösningar

10. Kemikalier i fast form ska upplösas eller suspenderas i lösningsmedel/vehikel och vid behov spädas ut före appliceringen på mössens öron. Kemikalier i vätskeform kan appliceras i ren eller utspädd form. Olösliga kemikalier, av den typ som ofta används i medicintekniska produkter, ska extraheras kraftigt i lämpligt lösningsmedel så att alla extraherbara beståndsdelar för testning fås ut före appliceringen på mössens öron. Testlösningarna ska beredas dagligen utom om stabilitetsdata visar att lagring kan accepteras.

Tillförlitlighetskontroll

11. Positiva kontrollkemikalier används för att påvisa att testsystemet har tillräcklig och reproducerbar känslighet för ett sensibiliserande testämne och att responsen har välkarakteriserad styrka. Användning av en parallell positiv kontroll rekommenderas eftersom den påvisar laboratoriets kompetens att genomföra testningar på ett framgångsrikt sätt och ger möjlighet att bedöma reproducerbarhet och jämförbarhet inom laboratoriet och mellan laboratorier. Även vissa tillsynsmyndigheter kräver att positiv kontroll används för varje testning och därför uppmuntras användarna att tillfråga relevanta myndigheter innan testning med LLNA-metoden genomförs. Likaså uppmuntras rutinanvändning av parallell positiv kontroll för att undvika tilläggstestning på djur i fall där myndigheterna inte godkänner periodiska positiva kontroller (se punkt 12). Den positiva kontrollen bör ge en positiv LLNA-respons på den exponeringsnivå som förväntas ge en ökning av stimulationsindex (SI) större än 3 jämfört med den negativa kontrollgruppen. Den positiva kontrollkemikaliens dos ska väljas så att den inte orsakar särskilt kraftig hudirritation eller systemisk toxicitet och att induktionen är reproducerbar men inte för kraftig (dvs. SI > 20 är ett för högt värde).

▼M3

Rekommenderade ämnen är 25-procentig hexylkanelaldehyd (CAS nr 101-86-0) i aceton-olivoljeblandning i förhållandet 4:1 (volym/volym) och 5-procentig merkaptobensotiazol (CAS nr 149-30-4) i *N,N*-dimetylformamid (se tillägg 1, tabell 1). I vissa fall kan även andra positiva kontrollkemikalier som uppfyller ovan angivna kriterier användas, förutsatt att tillbörlig motivering ges.

12. Trots att parallell positiv kontrollgrupp rekommenderas kan det finnas betingelser där det är tillräckligt med periodisk testning (dvs. minst var sjätte månad) av den positiva kontrollen – detta gäller laboratorier som regelbundet genomför LLNA (dvs. minst en gång i månaden) och har en etablerad historisk databas över positiva kontroller som påvisar laboratoriets förmåga att få reproducerbara och exakta resultat från dem. Tillräcklig kvalitet hos LLNA kan framgångsrikt påvisas genom enhetliga positiva resultat med den positiva kontrollen vid minst tio oberoende testningar som genomförs inom en skälig tidsperiod (kortare än ett år).

13. Parallell positiv kontrollgrupp ska alltid användas vid ändringar rörande testningsförfarandet (t.ex. ny personal, nya material och/eller reagenser, annorlunda utrustning, byte av testdjurens ursprung), och sådana ändringar bör dokumenteras i laboratorierapporter. Man bör överväga om dessa ändringar påverkar den tidigare etablerade historiska databasens lämplighet, för att kunna avgöra om det behövs en ny historisk databas för dokumentering av den positiva kontrollens resultatenhetlighet.

14. Man bör vara medveten om att beslut om att testa positiva kontroller med vissa intervaller i stället för parallellt har återverkningar på lämpligheten och godtagbarheten hos negativa undersökningsresultat som fås utan parallell positiv kontroll under den tid som löper mellan de periodiska testningarna av positiv kontroll. Om t.ex. falska negativa resultat fås vid ett periodiskt test av positiv kontroll, måste man kanske ifrågasätta resultat som erhållits mellan det sista godtagbara periodiska testet med positiv kontroll och ett icke-godtagbart periodiskt test med positiv kontroll. Följderna av dessa utfall bör övervägas noggrant när man avgör huruvida parallella positiva kontroller ska användas eller om de positiva kontrollerna enbart ska vara periodiska. Likaså bör man överväga att använda färre djur i den parallella positiva kontrollgruppen när detta är vetenskapligt motiverat och laboratoriet med stöd av laboratoriespecifika historiska data kan påvisa att detta är gångbart (12).

15. Även om det positiva kontrollämnet bör testas i en vehikel som veterligen framkallar enhetlig respons (t.ex. aceton-olivoljeblandning i förhållandet 4:1 [volym/volym]), kan det förekomma vissa föreskriftsreglerade situationer där det även krävs testning i en icke-standardmässig vehikel (kliniskt och kemiskt relevant formulering) (24). Om det parallella positiva kontrollämnet testas i en annan vehikel än den som används för testämnet, bör en separat vehikelkontrollgrupp användas för den parallella positiva kontrollen.

16. I fall där utvärdering görs av testämnen av en viss kemisk klass eller med en viss responsskala kan det också vara värdefullt med referensämnen för att påvisa att testmetoden fungerar tillfredsställande för bestämning av hudsensibiliseringspotentialen hos dessa typer av testämnen. Ett lämpligt referensämne ska ha följande egenskaper:

— Strukturell och funktionell likhet med den ämnesklass som testas.

— Kända fysikalisk-kemiska egenskaper.

— Stödjande data från LLNA.

— Stödjande data från andra djurmodeller och/eller från människor.

▼M3

TESTFÖRFARANDE

Antalet djur och dosnivåer

17. Det ska finnas minst fyra djur per dosgrupp och minst tre koncentrationer av testämnet. Det ska också finnas en parallell negativ kontrollgrupp som endast behandlas med samma vehikel som används för testämnet och en positiv kontroll (parallell eller nyligen gjord periodisk kontroll, i enlighet med laboratoriets principer rörande punkterna 11–14). Man bör överväga flera doser av det positiva kontrollämnet, särskilt när den positiva kontrollen testas periodiskt. Med undantag för behandling med testämnet bör djuren i kontrollgrupperna hanteras på exakt samma sätt som djuren i dosgrupperna.

18. Doserna och vehikeln bör väljas på grundval av rekommendationerna i hänvisningarna (3) och (5). Doserna väljs i regel enligt en lämplig koncentrationsserie såsom 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 % osv. Valet av koncentrationsserie ska ges tillbörlig vetenskaplig motivering. All existerande tillgänglig och relevant toxikologisk information (t.ex. akut toxicitet och hudirritation) samt strukturell och fysikalisk-kemisk information om testämnet (och/eller strukturellt besläktade ämnen) bör beaktas när man väljer de tre på varandra följande koncentrationerna så att den högsta koncentrationen ger maximal exponering samtidigt som systemisk toxicitet och särskilt kraftig lokal hudirritation undviks (3) (25). Om sådan information inte finns kan det vara nödvändigt med ett preliminärt screeningtest (se punkterna 21–24).

19. Vehikeln får inte störa eller snedvrida testresultaten och ska väljas med tanke på största möjliga löslighet och därmed högsta möjliga koncentration samtidigt som lösningen/suspensionen ska vara lämplig för applicering av testämnet. Som vehikel rekommenderas aceton-olivoljeblandning (4:1 volym/volym), *N,N*-dimetylformamid, metyletylketon, propylenglykol och dimetylsulfoxid (19) men även andra vehiklar kan användas förutsatt att tillräcklig vetenskaplig motivering kan ges. I vissa situationer kan det vara nödvändigt att som extra kontroll använda ett kliniskt relevant lösningsmedel eller en kommersiellt tillgänglig blandning där testämnet ingår. Särskild vikt bör fästas vid att se till att hydrofila testämnen inkorporeras i ett vehikelsystem som väter huden och som inte omedelbart rinner bort, genom att använda lämpliga solubiliserande ämnen (t.ex. 1-procentig Pluronic® L92). Det betyder att helt vattenbaserade vehiklar bör undvikas.

20. Genom analys av lymfnoder från individuella möss kan man bestämma variationer djuren emellan och göra en statistisk jämförelse av skillnaden mellan mätningar för testämnet och mätningarna i vehikelkontrollgruppen (se punkt 35). Möjligheten att minska antalet möss i den positiva kontrollgruppen finns endast när data samlas in individuellt per djur (12). Vidare gäller att vissa tillsynsmyndigheter kräver att data insamlas individuellt. Vissa tillsynsmyndigheter kan godkänna poolade djurdata och då kan man välja mellan att samla in djurdata individuellt eller poolat.

Preliminärt screeningtest

21. Om det inte finns information som grund för att bestämma högsta testdosen (se punkt 18) bör man göra ett preliminärt screeningtest för att definiera den lämpliga dosnivån för LLNA. Syftet med det preliminära screeningtestet är att få vägledning för valet av högsta dosnivå i huvudundersökningen, i fall där information saknas om vilken koncentration som inducerar systemisk toxicitet (se punkt 24) och/eller särskilt kraftig lokal hudirritation (se punkt 23). Den högsta dosnivå som testas ska vara 100 % testämne för vätskor eller högsta möjliga koncentration för fasta ämnen eller suspensioner.

▼M3

22. Det preliminära screeningtestet genomförs under identiska betingelser som huvudundersökningen, utom att proliferationen i lymfnoderna inte utvärderas och dosgruppen kan ha lägre antal djur. Ett eller två djur per dosgrupp föreslås. Alla möss observeras dagligen för kliniska tecken på systemisk toxicitet eller lokal irritation på appliceringsstället. Djurens kroppsvikt registreras före testningen och efter avslutad testning (dag 6). På varje mus observeras båda öronens hudrodnad och graderas enligt tabell 1 (25). Mätning av örontjocklek görs t.ex. med digital mikrometer eller Peacock Dialinstrument på dag 1 (före dosering), dag 3 (cirka 48 timmar efter den första dosen) och på dag 6. Dessutom kan örontjockleken bestämmas på dag 6 genom vägning av en öronbit som stansats ut efter skonsam avlivning. Särskilt kraftig lokal hudirritation indikeras genom gradering ≥ 3 för hudrodnad och/eller ökning av örontjockleken med ≥ 25 % på någon av mätningsdagarna (26) (27). Den högsta dos som väljs för huvudundersökningen blir nästa lägre dos i den preliminära screeningens koncentrationsserie (se punkt 18) som inte inducerar systemisk toxicitet och/eller särskilt kraftig hudirritation.

Tabell 1

Gradering av hudrodnad

Observation	Gradering
Ingen hudrodnad	0
Mycket svag hudrodnad (knappt skönjbar)	1
Väldefinierad hudrodnad	2
Moderat till svår hudrodnad	3
Svår hudrodnad (köttrodnad) till sårskorpebildning som utgör hinder för gradering av rodnaden	4

23. För identifiering av irriterande ämnen med LLNA har man utöver en 25-procentig ökning av örontjocklek (26) (27) också använt statistiskt signifikant ökning av örontjockleken hos behandlingsgruppens möss i jämförelse med kontrollgruppens möss (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34). Det kan dock uppstå statistiskt signifikanta ökningar av örontjocklek som är mindre än 25 %, men dessa har inte specifikt förknippats med särskilt kraftig irritation (30) (32) (33) (34).

24. Följande kliniska observationer kan indikera systemisk toxicitet (35) (36) när de används som del av en helhetsbedömning och kan således ge indikation om den högsta dosnivå som ska användas i huvudundersökningen: ändringar av nervsystemets funktion (t.ex. upprest päls, ataxi, skälvningar och konvulsioner), ändringar av beteende (t.ex. aggressivitet, ändringar av putsningsbeteende, markerad ändring av aktivitetsnivå), ändringar av andningsmönster (dvs. ändringar av andningens frekvens och intensitet, såsom dyspné, gäspande och rassel) samt ändringar av födo- och vattenintag. Vid utvärderingen ska man också beakta tecken på letargi och/eller avsaknad av reaktioner, alla slags kliniska tecken på mer än lätt eller momentan smärta eller lidande, minskning av kroppsvikten med mer än 5 % från dag 1 till dag 6 samt mortalitet. Döende djur och djur som visar tecken på uppenbar smärta eller svårt och ihållande lidande ska avlivas skonsamt (37).

▼M3

Huvudundersökningens försöksschema

25. Försöksschemat är upplagt enligt följande:

— *Dag 1:* Djuren märks individuellt och vikt samt eventuella kliniska observationer registreras. Applicera 25 µl lämpligt utspätt testämne, ren vehikel eller positivt kontrollämne (parallell eller nyligen utförd positiv kontroll, i enlighet med laboratoriets principer när det gäller punkterna 11–15) på båda öronens baksida.

— *Dagarna 2 och 3:* Upprepa applicering enligt dag 1.

— *Dagarna 4 och 5:* Ingen behandling.

— *Dag 6:* Registrera varje djurs vikt. Injicera 250 µl steril fosfatbuffrad saltlösning (PBS) som innehåller 20 µCi ($7{,}4 \times 10^5$ Bq) tritierad (^{3}H)-metyltymidin i alla test- och kontrolldjur via svansvenen. Alternativt kan 250 µl steril PBS som innehåller 2 µCi ($7{,}4 \times 10^4$ Bq) ^{125}I-jododeoxiuridin och 10^{-5}M fluorodeoxiuridin injiceras i alla testdjur via svansvenen. Avliva djuren skonsamt efter fem timmar. Skär bort de aurikulära dränerande lymfnoderna från varje öra och behandla dem tillsammans i PBS för varje djur (metoden med individuellt djur), eller skär bort lymfnoderna från varje öra och poola dem i PBS för varje behandlingsgrupp (metoden med poolad behandlingsgrupp). Närmare uppgifter och scheman för identifiering och dissekering av noder finns i hänvisning (12). För ytterligare kontroll av lokal hudrespons i huvudundersökningen kan tilläggsparametrar såsom gradering av örats hudrodnad eller mätningar av örats tjocklek (med tjockleksmätare eller genom vägning av utstansad bit vid obduceringen) införlivas i undersökningsprotokollet.

Beredning av cellsuspensioner

26. En suspension med enskilda celler bestående av lymfnodsceller (LNC) bilateralt utskurna från individuella djur eller från poolade behandlingsgrupper bereds genom försiktig mekanisk sönderdelning med hjälp av ett nät av rostfritt stål (200 mesh) eller annan godkänd teknik för beredning av en suspension med enskilda celler. Lymfnodscellerna tvättas två gånger med ett överskott PBS och DNA fälls ut med 5-procentig triklorättiksyra (TCA) vid 4 °C under 18 timmar (3). Fällningen återupplöses i 1 ml TCA och överförs till skintillationskärl med 10 ml skintillationsvätska för ^{3}H-räkning eller överförs direkt till gammaräkningsrör för ^{125}I-räkning.

Bestämning av cellproliferationen (radioaktivt innehåll)

27. Innehållet av ^{3}H-metyltymidin bestäms genom β-skintillationsräkning såsom sönderfallet per minut (DPM). Innehållet av ^{125}I-jododeoxiuridin bestäms genom ^{125}I-räkning och uttrycks även som DPM. Beroende på vilken metod som har valts uttrycks innehållet som DPM/djur (metod med individuella djur) eller DPM/behandlingsgrupp (metod med poolning).

Reducerat LLNA (rLLNA)

28. I situationer där det finns lagstiftade krav på att bekräfta negativ förutsägelse för hudsensibiliserande potential kan man använda rLLNA (16) (17) (18), dvs. ett protokoll med färre djur, förutsatt att alla andra LLNA-protokollspecifikationer följs enligt beskrivningen för denna testmetod. För användning av rLLNA krävs klara motiveringar och vetenskapliga belägg. Om resultaten är positiva eller tvetydiga kan det krävas ytterligare testning för att tolka eller förtydliga dem.

▼M3

29. Minskningen av antalet dosgrupper är den enda skillnaden mellan LLNA och rLLNA och den medför att man inte får information om dos-responsförhållande. Därför ska rLLNA inte användas om sådan information krävs. På samma sätt som med flerdos-LLNA ska testämneskoncentrationen för rLLNA vara den högsta koncentration som inte inducerar systemisk toxicitet och/eller lokal hudirritation hos mössen (se punkt 18).

OBSERVATIONER

Kliniska observationer

30. Varje mus bör observeras minst dagligen med tanke på eventuella kliniska tecken – lokal irritation vid appliceringsstället eller tecken på systemisk toxicitet. Alla observationer registreras systematiskt, med individuella registreringar för varje mus. Övervakningsplanerna bör inbegripa kriterier för omedelbar identifiering av tecken på systemisk toxicitet, särskilt kraftig hudirritation eller hudkorrosion så att berörda djur kan avlivas (37).

Kroppsvikt

31. Enligt det som anges i punkt 25 ska de individuella djurens vikt registreras vid testets början och strax före den schemalagda avlivningen.

BERÄKNING AV RESULTATEN

32. Resultaten för varje behandlingsgrupp uttrycks som stimulationsindex. När metoden med individuella djur används erhålls stimulationsindex genom att genomsnittligt DPM/djur inom varje testämnesgrupp och den positiva kontrollgruppen divideras med genomsnittligt DPM/djur för lösningsmedels-/vehikelkontrollgruppen. Värdet på genomsnittligt stimulationsindex för vehikelkontrollgrupperna är då 1. När poolning används erhålls stimulationsindex genom att dividera det poolade radioaktiva innehållet för varje testämnesgrupp med innehållet i den poolade vehikelkontrollgruppen, och resultatet är det genomsnittliga stimulationsindexet.

33. Ett resultat anses vara positivt när stimulationsindex ≥ 3. Man kan dock även använda dosresponsens styrka samt den statistiska signifikansen och enhetligheten hos responsen i kontrollgruppen för lösningsmedel/vehikel och i den positiva kontrollen när man fastställer huruvida ett gränsresultat ska anses vara positivt (4)(5)(6).

34. Vid behov kan de erhållna resultaten förtydligas ytterligare genom en granskning av testämnets olika egenskaper, inbegripet eventuell strukturell släktskap med kända hudsensibiliserande ämnen, huruvida ämnet orsakar särskilt kraftig lokal hudirritation hos mössen samt naturen hos det iakttagna dos–responsförhållandet. Dessa och andra aspekter diskuteras närmare i andra källor (7).

35. När radioaktivitetsdata samlas in för enskilda möss kan dessa data användas för en statistisk analys rörande förekomsten av dosrespons och graden av dos–responsförhållande. Alla statistiska analyser kan inbegripa en utvärdering av dos–responsförhållandet och en lämpligt anpassad jämförelse mellan testgrupper (t.ex. parvisa jämförelser mellan doseringsgrupp och parallell vehikelkontrollgrupp). De statistiska analyserna kan t.ex. innehålla linjär regression eller Williams test för utvärdering av dos–responstrender och Dunnetts test för parvisa jämförelser. Vid valet av lämplig metod för den statistiska analysen bör man vara medveten om eventuella olikheter hos varianserna och andra relaterade problem som kan göra det nödvändigt att göra en datatransformation eller en icke-parametrisk statistisk analys. Det kan också vara nödvändigt att genomföra beräkningar av stimulationsindex och statistiska analyser med och utan vissa datapunkter (s.k. outliers – utanförliggande värden).

▼M3

DATA OCH RAPPORTERING

Data

36. Data ska sammanställas i tabellform. När metoden med individuella djur används anges DPM-värden per individuellt djur, gruppens medelvärde för DPM per djur, den associerade feltermen (t.ex. SD, SEM) och medelvärdet för stimulationsindex för varje dosgrupp jämfört med den parallella vehikelkontrollgruppen. När metoden med poolning används anges medel-/medianvärdet för DPM och medelvärdet för stimulationsindex för varje dosgrupp jämfört med den parallella vehikelkontrollgruppen.

Testrapport

37. Testrapporten ska innehålla nedan angivna uppgifter.

Test- och kontrollämnen:

— Identifieringsdata (t.ex. CAS-nummer och EG-nummer om dessa är kända, källa, renhet, kända orenheter, satsnummer).

— Fysikalisk natur och fysikalisk-kemiska egenskaper (t.ex. flyktighet, stabilitet, löslighet).

— För blandningar anges sammansättning och beståndsdelarnas relativa procentandelar.

Lösningsmedel/vehikel:

— Identifieringsdata (renhet, koncentration [om tillämpligt], volym som har använts).

— Motivering för val av vehikel.

Testdjur:

— CBA-mössens ursprung.

— Mikrobiologiska data för djuren, om dessa data är kända.

— Antal djur och deras ålder.

— Ursprung, inhysningsförhållanden, foder och dylikt.

Testbetingelser:

— Detaljerade uppgifter om beredning och applicering av testämnet.

— Motivering för valet av dos (även resultat från preliminär screening om sådan har genomförts).

— Koncentrationerna för vehikel och testämne samt totala mängden testämne som applicerats.

— Detaljerade uppgifter om foder- och vattenkvalitet (inbegripet diettyp/källa, vattenkälla).

— Detaljerad beskrivning av behandlings- och provtagningsscheman.

— Metoder för mätningar av toxicitet.

— Kriterier för att fastställa om resultatet är positivt eller negativt.

— Uppgifter rörande eventuella avvikelser från protokollet och redogörelse för hur avvikelsen påverkar undersökningens utformning och resultat.

Tillförlitlighetskontroll:

— Sammanfattning av resultaten från senaste tillförlitlighetskontroll, inklusive information om testämne, koncentration och vehikel.

— Testningslaboratoriets data från parallella och/eller historiska positiva kontroller och negativa kontroller.

▼M3

— Om försöket inte omfattade parallell positiv kontroll, ange datum och laboratorierapport för senaste periodiska positiva kontroll och en rapport med uppgifter om laboratoriets historiska data för positiva kontroller som motivering för varför parallell positiv kontroll inte har använts.

Resultat:

— Mössens individuella vikt vid doseringsstart och vid schemalagd avlivning, såväl som medelvärde och associerad felterm (t.ex. SD, SEM) för varje behandlingsgrupp.

— Tidpunkten för första upptäckt av tecken på toxicitet, även eventuell hudirritation vid appliceringsstället, för varje försöksdjur.

— En tabell med individuella värden per mus (metoden med individuella djur) eller medelvärde/medianvärde (metoden med poolning) och värden på stimulationsindex för varje behandlingsgrupp.

— Medelvärde och associerad felterm (t.ex. SD, SEM) för DPM per mus för varje behandlingsgrupp och resultaten från analys av utanförliggande värden för varje behandlingsgrupp när metoden med individuella djur används.

— Beräknat stimulationsindex och ett lämpligt mått på variabilitet som beaktar variationen djuren emellan både i testämnesgruppen och i kontrollgruppen när metoden med individuella djur används.

— Förhållandet mellan dos och respons.

— Statistisk analys, om tillämpligt.

Diskussion om resultaten:

— En kort kommentar om resultaten, dos–responsanalys och statistiska analyser (i tillämpliga fall), med en slutsats om huruvida testämnet ska anses vara hudsensibiliserande.

HÄNVISNINGAR

(1) OECD (2002), Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay. OECD Guideline for the Testing of Chemicals No 429, Paris. Finns på: http://www.oecd.org/env/testguidelines

(2) Kimber, I. och 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. och 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. och 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. och 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. och 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. och 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. och 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. Finns på: http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNA-PerfStds.pdf

(13) OECD (1992), *Skin Sensitisation*. OECD Guideline for Testing of Chemicals No 406, OECD, Paris. Finns på: 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. Finns på: http://www.oecd.org/env/testguidelines

(15) Dearman, R.J., Hilton, J., Evans, P., Harvey, P., Basketter, D.A. och 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. och 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. Finns på: 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 No 09–6439, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Finns på: 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. Finns på: 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. och 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. och 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 No 10–7512, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences, Finns på: http://iccvam.niehs.nih.gov/

(23) ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, 7:e uppl. 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. Finns på: 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. och 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. Finns på: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf

(28) Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S. och 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. och 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. och 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. och 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. och 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. och 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. Finns på: 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, Finns på: 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. Finns på: http://www.oecd.org/env/testguidelines

▼M3

Tillägg 1

Prestandastandarder för bedömning av föreslagna liknande eller modifierade LLNA-testmetoder för hudsensibilisering

INLEDNING

1. Syftet med prestandastandarder är att tillhandahålla en grund när man fastställer att nya testmetoder, både äganderättsligt skyddade (dvs. metoder med upphovsrätt, varumärke eller registrering) och allmänt tillgängliga metoder, är tillräckligt exakta och tillförlitliga för specifika testningsändamål. Dessa prestandastandarder, som grundar sig på validerade och godtagna testmetoder, kan användas för att utvärdera tillförlitligheten och exaktheten hos andra liknande metoder (vardagligt kallade ”me too”-test) som grundar sig på liknande vetenskapliga principer och som mäter eller förutser samma biologiska eller toxikologiska effekt (14).

2. Innan man antar modifierade metoder (dvs. föreslagna potentiella förbättringar av en godkänd testmetod) krävs en utvärdering för att fastställa de föreslagna ändringarnas inverkan på testets prestanda och i vilken utsträckning sådana förändringar påverkar den tillgängliga informationen för de andra komponenterna i valideringsprocessen. Beroende på de föreslagna ändringarnas antal och karaktär, genererade data och stödjande dokumentation för ändringarna, bör de antingen vara föremål för samma valideringsprocess som gäller för nya testmetoder eller, där det är lämpligt, för en begränsad bedömning av tillförlitlighet och relevans med användning av etablerade prestandastandarder (14).

3. När liknande eller modifierade metoder föreslås för användning inom denna testmetod bör deras tillförlitlighet och exakthet utvärderas med hjälp av kemikalier som representerar hela skalan av LLNA-utfall. För att omotiverad användning av djur ska undvikas rekommenderas starkt att de som utvecklar modeller först konsulterar lämpliga myndigheter innan valideringsstudier inleds enligt de prestandastandarder och den vägledning som anges i denna testmetod.

4. Dessa prestandastandarder baserar sig på de harmoniserade prestandastandarderna, US-ICCVAM (Förenta staterna), EC ECVAM (EG) och JaCVAM (Japan) (12), för utvärdering av validiteten hos liknande eller modifierade versioner av LLNA. Prestandastandarderna består av testmetodens grundläggande komponenter, rekommenderade referenskemikalier samt de standarder för exakthet och tillförlitlighet som en föreslagen metod minst måste uppfylla.

I. **Testmetodens grundläggande komponenter**

5. För att se till att liknande eller modifierade LLNA-metoder är funktionellt och mekaniskt analoga med LLNA och mäter samma biologiska verkan, måste testmetodprotokollet innehålla följande komponenter:

— Testämnet ska appliceras på mössens båda öron.

— Proliferationen av lymfocyter ska mätas i de lymfnoder som dränerar det område där testämnet appliceras.

— Proliferationen av lymfocyter ska mätas under hudsensibiliseringens induktionsfas.

▼M3

— Den högsta dosen som väljs för ett testämne ska vara den högsta koncentrationen som inte inducerar systemisk toxicitet och/eller särskilt kraftig lokal hudirritation hos mössen. För positiva referenskemikalier ska den högsta dosen vara minst lika hög som LLNA EC3-värdena för motsvarande referenskemikalier (se tabell 1) utan att det uppstår systemisk toxicitet och/eller särskilt kraftig hudirritation hos mössen.

— Varje försök ska omfatta en parallell vehikelkontrollgrupp och, där det är lämpligt, en parallell positiv kontrollgrupp.

— Varje dosgrupp ska omfatta minst fyra djur.

— Insamlingen av data kan ske på individuell eller poolad grund.

Om något av dessa kriterier inte uppfylls kan dessa prestandastandarder inte användas för validering av en liknande eller modifierad metod.

II. **Minimiförteckning över referenskemikalier**

6. I de harmoniserade prestandastandarderna US-ICCVAM, EC-ECVAM och JaCVAM (12) anges 18 referenskemikalier som minst måste användas och 4 alternativa referenskemikalier (dvs. ämnen som ger antingen falska positiva eller falska negativa resultat i LLNA, jämfört med resultat från människor och marsvin [B.6 eller OECD:s testriktlinje 406] (13) och som därför ger möjlighet att påvisa samma eller bättre prestanda än LLNA) som ingår i prestandastandarderna för LLNA. För kemikalierna användes följande urvalskriterier:

— Förteckningen över referenskemikalier representerar de typer av ämnen som typiskt testas för sin hudsensibiliseringspotential och den responsskala som kan mätas eller förutses med LLNA.

— Ämnena har en väldefinierad kemisk struktur.

— LLNA-data från test på marsvin (dvs. B.6; OECD:s testriktlinje 406) (13) och (där det är möjligt) data från människor finns att tillgå för varje ämne.

— Ämnena kan enkelt införskaffas på marknaden.

De rekommenderade referenskemikalierna förtecknas i tabell 1. När de föreslagna referenskemikalierna används i ett försök ska de utvärderas i den vehikel som de förtecknas med i tabell 1. I situationer där ett förtecknat ämne inte finns att tillgå kan man använda andra ämnen som uppfyller urvalskriterierna, förutsatt att tillbörlig motivering kan ges.

▼M3

Tabell 1

Rekommenderade referenskemikalier för prestandastandarder för LLNA

Nummer	Kemikalie (1)	CAS-nummer	Form	Veh (2)	EC3 % (3)	N (4)	0,5x – 2,0x EC3	Faktisk EC3-skala	LLNA vs GP	LLNA vs mänsklig
1	5-klor-2-metyl-4-isotiazolin-3-on (CMI)/2-metyl-4-isotiazolin-3-on (MI) (5)	26172-55-4/ 2682-20-4	Vätska	DMF	0,009	1	0,0045–0,018	NC	+/+	+/+
2	DNCB	97-00-7	Fast	AOO	0,049	15	0,025–0,099	0,02–0,094	+/+	+/+
3	4-fenylendiamin	106-50-3	Fast	AOO	0,11	6	0,055–0,22	0,07–0,16	+/+	+/+
4	Koboltklorid	7646-79-9	Fast	DMSO	0,6	2	0,3–1,2	0,4–0,8	+/+	+/+
5	Isoeugenol	97-54-1	Vätska	AOO	1,5	47	0,77–3,1	0,5–3,3	+/+	+/+
6	2-merkaptobensotiazol	149-30-4	Fast	DMF	1,7	1	0,85–3,4	NC	+/+	+/+
7	Citral	5392-40-5	Vätska	AOO	9,2	6	4,6–18,3	5,1–13	+/+	+/+
8	HCA	101-86-0	Vätska	AOO	9,7	21	4,8–19,5	4,4–14,7	+/+	+/+
9	Eugenol	97-53-0	Vätska	AOO	10,1	11	5,05–20,2	4,9–15	+/+	+/+
10	Fenylbensoat	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	NC	+/+	+/+
12	Imidazolidinylurea	39236-46-9	Fast	DMF	24	1	12–48	NC	+/+	+/+
13	Metylmetakrylat	80-62-6	Vätska	AOO	90	1	45–100	NC	+/+	+/+
14	Klorbensen	108-90-7	Vätska	AOO	25	1	NA	NA	–/–	–/ (*)
15	Isopropanol	67-63-0	Vätska	AOO	50	1	NA	NA	–/–	–/+

▼M3

Nummer	Kemikalie ([1])	CAS-nummer	Form	Veh ([2])	EC3 % ([3])	N ([4])	0,5x – 2,0x EC3	Faktisk EC3-skala	LLNA vs GP	LLNA vs människa
16	Mjölksyra	50-21-5	Vätska	DMSO	25	1	NA	NA	–/–	–/ (*)
17	Metylsalicylat	119-36-8	Vätska	AOO	20	9	NA	NA	–/–	–/–
18	Salicylsyra	69-72-7	Fast	AOO	25	1	NA	NA	–/–	–/–
Alternativa ämnen för att påvisa bättre prestanda jämfört med LLNA										
19	Natriumlaurylsulfat	151-21-3	Fast	DMF	8,1	5	4,05–16,2	1,5–17,1	+/–	+/–
20	Etylenglykoldimetakrylat	97-90-5	Vätska	MEK	28	1	14–56	NC	+/–	+/+
21	Xylen	1330-20-7	Vätska	AOO	95,8	1	47,9–100	NC	+/ (**)	+/–
22	Nickelklorid	7718-54-9	Vätska	DMSO	5	2	NA	NA	–/+	–/+

Förkortningar: AOO = aceton:olivolja (4:1, volym/volym), CAS-nummer = Chemical Abstracts Service-nummer, DMF = *N,N*-dimetylformamid, DMSO = dimetylsulfoxid, DNCB = 2,4-dinitroklorbensen, EC3 = uppskattad koncentration som krävs för att få stimulationsindex 3, Fast = fast ämne, GP = testresultat från marsvin (dvs. B.6 eller OECD:s testriktlinje 406) (13), HCA = hexylkanelaldehyd, LLNA = resultat från murint lokalt lymfnodtest (dvs. B.42 eller OECD:s testriktlinje 429) (1), MEK = metyletylketon, NA = inte tillämpligt eftersom stimulationsindex < 3, NC = ej beräknat eftersom data erhölls från ett enskilt försök, Veh = testvehikel, Vätska = ämne i vätskeform.

(*) Antas inte vara sensibiliserande för människor eftersom inga resultat från kliniska lapptest kunde fås fram, ämnet ingår inte som en allergen i lapptest och inga rapporter om sensibilisering hos människa kunde fås fram.

(**) GP-data finns inte att tillgå.

([1]) Kemikalierna ska beredas dagligen utom om stabilitetsdata visar att lagring kan accepteras.

([2]) Eftersom olika vehiklar potentiellt kan påverka LLNA-testprestanda bör endast den rekommenderade vehikeln för respektive referenskemikalie användas (24) (32).

([3]) Medelvärde i fall där flera EC3-värden fanns att tillgå. För negativa ämnen (dvs. med stimulationsindex < 3) anges den högsta testade koncentrationen.

([4]) Antalet LLNA-försök från vilka data erhållits.

([5]) Kommersiellt tillgängligt som Kathon CG (CAS-nummer 55965-84-9), som är en 3:1-blandning av CMI and MI. De relativa koncentrationerna för varje komponent varierar från 1,1 % till 1,25 % (CMI) och 0,3 % till 0,45 % (MI). De inaktiva komponenterna är magnesiumsalter (21,5 % till 24 %) och kopparnitrat (0,15 % till 0,17 %), och den återstående formuleringen är 74–77 % vatten. Kathon CG fås från Sigma-Aldrich och Rohm and Haas (numera Dow Chemical Corporation).

▼M3

III. **Definierad tillförlitlighet och standarder för exakthet**

7. Exaktheten hos en liknande eller modifierad LLNA-metod ska vara samma som eller högre än för prestandastandarderna för LLNA när utvärderingen görs med det minsta tillåtna antalet (18) referenskemikalier. Den nya eller modifierade metoden bör ge korrekt klassificering enligt en ja-/nej-beslutsväg. Det kan dock hända att den nya eller modifierade metoden inte ger korrekt klassificering av alla de kemikalier som minst måste användas. Om t.ex. ett av de svaga sensibiliserande ämnena klassificeras fel, kan en motivering för felklassificeringen och lämpliga tilläggsuppgifter (t.ex. testresultat som ger korrekt klassificering för andra ämnen med liknande fysikaliska, kemiska och sensibiliserande egenskaper) anses påvisa likvärdiga prestanda. Under sådana omständigheter utvärderas valideringsstatus för den nya eller modifierade LLNA-testmetoden från fall till fall.

Reproducerbarhet inom laboratoriet

8. För bestämning av reproducerbarheten inom ett laboratorium ska en ny eller modifierad LLNA-metod utvärderas med ett sensibiliserande ämne som är väl karakteriserat i LLNA. Prestandastandarderna för LLNA grundar sig därför på hur resultaten varierar mellan upprepade testningar av hexylkanelaldehyd. För bedömning av tillförlitligheten inom laboratoriet bör värden för uppskattad koncentrationströskel (ECt) för hexylkanelaldehyd härledas vid fyra separata tillfällen med minst en vecka mellan testningarna. Reproducerbarheten inom laboratoriet anses vara godtagbar om varje hexylkanelaldehydtest ger ECt-värden mellan 5 % och 20 %, vilket representerar skalan 0,5–2,0 gånger det medelvärde för EC3 som specificeras för hexylkanelaldehyd (10 %) i LLNA (se tabell 1).

Reproducerbarhet mellan laboratorier

9. För bestämning av reproducerbarheten mellan laboratorier bör en ny eller modifierad LLNA-metod utvärderas med två sensibiliserande ämnen som är väl karakteriserade i LLNA. Prestandastandarderna för LLNA grundar sig på variationerna i resultat från testning av hexylkanelaldehyd och 2,4-dinitroklorbensen (DNCB) i olika laboratorier. ECt-värdena bör tas fram genom enskilda fristående försök i minst tre separata laboratorier. Reproducerbarheten mellan laboratorier anses vara godtagbar om varje laboratorium får ECt-värden som är 5–20 % för hexylkanelaldehyd och 0,025–0,1 % för 2,4-dinitroklorbensen, vilket representerar skalan 0,5–2,0 gånger det EC3-medelvärde som specificeras för hexylkanelaldehyd (10 %) och 2,4-dinitroklorbensen (0,05 %) i LLNA (se tabell 1).

▼M3

Tillägg 2

Definitioner

Exakthet: Mått på hur väl testmetodresultaten och de godtagna referensvärdena överensstämmer med varandra. Exakthet är ett mått på testmetodens prestanda och en relevansaspekt. Detta begrepp används ofta omväxlande med ”konkordans” för att beskriva andelen korrekta resultat med en testmetod (14).

Referensämne: Sensibiliserande eller icke-sensibiliserande ämne som används som standard för jämförelse med ett testämne. Ett referensämne ska ha följande egenskaper: i) En eller flera enhetliga och tillförlitliga källor. ii) Strukturell och funktionell likhet med den ämnesklass som testas. iii) Kända fysikalisk-kemiska egenskaper. iv) Stödjande data om kända effekter. v) Känd styrka inom det avsedda responsområdet.

Uppskattad koncentrationströskel (ECt): Uppskattad testämneskoncentration som krävs för att ge ett stimulationsindex som tyder på positiv respons.

Uppskattad koncentration tre (EC3): Uppskattad testämneskoncentration som krävs för att ge värdet tre för stimulationsindex.

Falskt negativt: Ett testämne som felaktigt har identifierats som negativt eller icke-aktivt genom en testmetod trots att ämnet i själva verket är positivt eller aktivt.

Falskt positivt: Ett testämne som felaktigt har identifierats som positivt eller aktivt genom en testmetod trots att ämnet i själva verket är negativt eller icke-aktivt.

Fara: Potentialen för skadliga verkningar på hälsa eller miljö. De skadliga verkningarna visar sig enbart om exponeringsnivån är tillräcklig.

Reproducerbarhet mellan laboratorier: Ett mått på i hur stor utsträckning olika kvalificerade laboratorier kan producera kvalitativt och kvantitativt liknande resultat, med användning av samma protokoll och samma testämnen. Reproducerbarheten mellan laboratorier fastställs under förvalideringen och valideringen och den indikerar i hur stor utsträckning ett test framgångsrikt kan överföras mellan laboratorier (14).

Reproducerbarhet inom laboratoriet: Ett mått på i vilken utsträckning kvalificerade personer inom samma laboratorium framgångsrikt kan upprepa resultat vid olika tidpunkter när de använder ett visst protokoll.

Me too-test: Ett vardagligt uttryck för en testmetod som strukturellt och funktionellt liknar en validerad och godtagen referenstestmetod. En sådan testmetod kan vara en kandidat för jämförande validering. Kallas även ”liknande testmetod” (14).

Utanförliggande värde: Ett utanförliggande värde (”outlier”) är en observation som markant skiljer sig från de övriga värdena i ett slumpmässigt urval från en population.

Prestandastandarder (PS): Standarder som baseras på en validerad testmetod och som utgör grunden för utvärdering av jämförbarheten för en föreslagen testmetod som är funktionellt och mekaniskt likartad. Dessa standarder omfattar i) testmetodens grundläggande komponenter, ii) en minimiförteckning med referenskemikalier som valts ut från de kemikalier som använts för att påvisa att den validerade testmetoden fungerar tillfredsställande och iii) de liknande nivåer av exakthet och tillförlitlighet, på grundval av vad som erhållits för den validerade testmetoden, som den föreslagna testmetoden bör påvisa när den utvärderas med användning av minimiförteckningen med referenskemikalier (14).

Äganderättsligt skyddad testmetod: En testmetod vars tillverkning och distribution begränsas genom patent, upphovsrätter, varumärken och dylikt.

▼**M3**

Kvalitetssäkring: En styrningsprocess där personer som är i oberoende ställning i förhållande till de personer som genomför testningen bedömer hur standarder, krav och registreringsförfaranden för laboratorietestning följs och hur exakt data förmedlas.

Referenskemikalier: Kemikalier som valts för användning i valideringsprocessen och för vilka responsen i *in vitro*- eller *in vivo*-referenstestsystem eller på de berörda arterna är känd. Kemikalierna bör vara representativa för de kemikalieklasser som testmetoden är avsedd för och bör representera hela skalan av respons som kan förväntas för de kemikalier som testas med metoden, från stark till svag till negativ. Det kan krävas olika uppsättningar referenskemikalier för valideringsprocessens olika skeden och för olika testmetoder och testanvändningar (14).

Relevans: Beskrivning av förhållandet mellan testet och den berörda effekten och huruvida detta förhållande är meningsfullt och användbart för ett visst ändamål. Relevansen är ett mått på hur väl man genom testet korrekt kan mäta och förutse den biologiska effekt det gäller. Relevans omfattar också överväganden om en testmetods exakthet (konkordans) (14).

Tillförlitlighet: Ett mått på i vilken utsträckning en testmetod kan reproduceras inom och mellan laboratorier över tiden när metoden utförs med samma protokoll. Den bedöms genom att man beräknar reproducerbarheten inom och mellan laboratorier (14).

Hudsensibilisering: En immunologisk process som följer av att en mottaglig individ exponeras ytvägen för en inducerande kemisk allergen som provocerar en kutan immunrespons som kan leda till att det uppstår kontaktsensibilisering.

Stimulationsindex (SI): Ett värde som beräknas för att bedöma hudsensibiliseringspotentialen hos ett testämne och som är förhållandet mellan proliferationen i behandlingsgrupperna och proliferationen i den parallella vehikelkontrollgruppen.

Testämne (kallas också testkemikalie): Alla ämnen eller blandningar som testas med denna testmetod.

Validerad testmetod: En testmetod för vilken valideringsstudier har genomförts för att fastställa relevans (inbegripet exakthet) och tillförlitlighet för ett specifikt ändamål. Det är viktigt att notera att en validerad testmetod kanske inte är tillräckligt exakt och tillförlitlig när det gäller ett visst föreslaget ändamål (14).

▼B

B.43 **TEST AVSEENDE NEUROTOXICITET PÅ GNAGARE**

1. **METOD**

Denna metod motsvarar OECD TG 424 (1997).

Med testmetoden fås information som bekräftar eller ytterligare karakteriserar en kemikalies förmåga att framkalla neurotoxicitet hos vuxna djur. Testmetoden kan kombineras med tidigare metoder för toxicitetstest med upprepad dos eller den kan användas separat. Det rekommenderas att OECD:s vägledning om strategier och metoder rörande testning av neurotoxicitet (se hänvisning 1) används som hjälp när man utformar försök som baserar sig på denna testmetod. Detta är särskilt viktigt när man överväger modifikationer av testmetodens normala observationer och förfaranden. OECD:s vägledning är avsedd som hjälp vid valet av alternativa testförfaranden som kan behövas i specifika omständigheter.

Metoden omfattar inte bedömningen av utvecklingsneurotoxicitet.

1.1 INLEDNING

Vid bedömning och utvärdering av en kemikalies toxiska egenskaper är det viktigt att ta hänsyn till kemikaliens förmåga att framkalla neurotoxiska verkningar. Redan i metoden för test avseende systemisk toxicitet med upprepad dos ingår observationer avsedda att påvisa förmågan att framkalla neurotoxicitet. Med hjälp av föreliggande testmetod kan man få ytterligare information om eller bekräfta de neurotoxiska verkningar som har observerats vid undersökning av systemisk toxicitet med upprepad dos. För vissa klasser av kemikalier kan en analys av förmågan att framkalla neurotoxicitet tyda på att det är lämpligare att använda föreliggande metod direkt, och inte bygga på indikationer på neurotoxicitet från undersökningar av systemisk toxicitet med upprepad dos. En sådan analys kan omfatta exempelvis följande:

— des signes de neurotoxicité ou des lésions neuropathologiques sont observés dans des études de toxicité autres que des études de toxicité systémique à dose répétée, ou

— Strukturellt släktskap eller annan information som länkar kemikalien i fråga till ämnen med känd neurotoxicitet.

Det kan även finnas andra tillfällen då det är lämpligt att använda föreliggande testmetod (se hänvisning 1).

Metoden har utformats så att den kan anpassas till särskilda behov att bekräfta en kemikalies specifika histopatologiska och beteenderelaterade neurotoxicitet, eller ge en möjlighet att karakterisera och kvantifiera neurotoxisk respons.

▼B

Tidigare likställdes neurotoxicitet med neuropati som inbegriper neuropatologiska skador eller neurologiska funktionsstörningar såsom förlamning, paralys eller tremor. Även om neuropati är en betydande manifestation av neurotoxicitet, vet man numera att det finns många andra tecken på nervsystemtoxicitet (förlust av motorisk koordination, sensoriska brister, inlärnings- och minnesstörningar), vilka inte alltid kommer fram vid undersökning av neuropati eller andra slags studier.

Syftet med föreliggande testmetod är att få fram betydande neurobeteenderelaterade och neuropatologiska verkningar hos vuxna gnagare. Trots att beteenderubbningar, även i frånvaron av morfologiska ändringar, kan tyda på skadliga verkningar på organismen, är dock inte alla beteenderubbningar specifika för nervsystemet. Alla observerade ändringar bör därför utvärderas tillsammans med korrelativa histopatologiska, hematologiska eller biokemiska data samt data om andra typer av systemisk toxicitet. Den testmetod som beskrivs här och vars syfte är att karakterisera och kvantifiera neurotoxisk respons inbegriper specifika histopatologiska och beteenderelaterade förfaranden som ytterligare kan kompletteras med elektrofysiologiska och/eller biokemiska undersökningar (se hänvisning 1, 2, 3 och 4).

Neurotoxiska ämnen kan verka på flera olika mål inom nervsystemet och genom flera olika mekanismer. Så länge som det inte finns ett enda system med vars hjälp alla ämnen kunde testas på djupet med avseende på neurotoxicitet, kan det vara nödvändigt att använda andra *in vivo*- eller *in vitro*-test som är specifika för den typ av neurotoxicitet som observeras eller förväntas.

Föreliggande testmetod kan även, i kombination med OECD:s vägledning om strategier och metoder rörande testning av neurotoxicitet (se hänvisning 1), användas som grund för test där man vill ytterligare karakterisera eller öka känsligheten hos dosresponskvantifieringen, och på så sätt få en bättre uppskattning av nivån för inga påvisbara skadliga verkningar eller bekräfta en kemikalies kända eller misstänkta skadliga verkningar. Man kan exempelvis utforma test för identifiering och utvärdering av de neurotoxiska mekanismerna eller test vars resultat kompletterar tillgängliga data från tidigare grundläggande observationer rörande neurobeteende och neuropatologi. Sådana test behöver inte ge samma resultat som kan fås med de standardförfaranden som rekommenderas i föreliggande metod, till den del dessa data redan finns och inte kan anses vara nödvändiga för tolkning av resultaten.

Detta neurotoxicitetstest ger, fristående eller som del av en kombination, följande möjligheter:

— Identifiera om nervsystemet påverkas permanent eller tillfälligt av den kemikalie som testas.

— Bidra till karakteriseringen av de nervsystemrubbningar som hör samman med exponering för kemikalien, och skapa en förståelse för de underliggande mekanismerna.

▼B

— Bestämma dos- och tid-responsförhållanden i syfte att uppskatta en nivå där inga verkningar kan påvisas (och som kan användas för att fastställa säkerhetskriterier för kemikalien).

Vid test enligt denna metod används oral tillförsel av testämnet. Det kan vara lämpligare med andra tillförselvägar (exempelvis via huden eller inandning). I förekommande fall måste då eventuellt de rekommenderade förfarandena modifieras. Överväganden om valet av tillförselväg ska basera sig på profilen för exponering på människor och tillgänglig toxikologisk eller kinetisk information.

1.2 DEFINITIONER

Skadlig verkning: Varje sådan behandlingsrelaterad avvikelse från normaltillståndet som minskar organismens förmåga att överleva, föröka sig eller anpassa sig till omgivningen.

Dos: Den mängd testämne som tillförs. Dosen uttrycks som vikt (g, mg), vikten testämne per viktenhet försöksdjur (exempelvis mg/kg) eller en konstant utfodringskoncentration (ppm).

Dosering: Ett allmänt begrepp som inbegriper dos, dess frekvens och varaktighet.

Neurotoxicitet: En skadlig förändring i nervsystemets struktur eller funktion till följd av exponering för ett kemiskt, biologiskt eller fysikaliskt ämne.

Neurotoxiskt ämne: Varje kemiskt, biologiskt eller fysikaliskt ämne som har förmågan att framkalla neurotoxicitet.

NOAEL: Förkortning för ”no-observed-adverse-effect level” (nivå vid vilken inga skadliga verkningar observeras). Detta är den högsta dosnivån vid vilken inga skadliga behandlingsrelaterade verkningar kan observeras.

1.3 PRINCIP FÖR TESTMETODEN

Testämnet tillförs oralt i ett urval doser till flera grupper med laboratoriegnagare. I regel behövs upprepade doser. Doseringsscheman kan gälla subakut toxicitet (28 dagar), subkronisk toxicitet (90 dagar) eller kronisk toxicitet (1 år eller längre). Förfarandet som beskrivs här kan även användas för undersökning av akut neurotoxicitet. Djuren testas i syfte att få fram eller karakterisera beteenderelaterade och/eller neurologiska rubbningar. Under observationsperioderna görs bedömning av ett antal beteenden som kan påverkas av neurotoxiska ämnen. Efter avslutat test tas en undergrupp per kön från varje grupp för perfusion *in situ,* och snitt av hjärna, ryggrad och perifera nerver prepareras och undersöks.

Om testet görs fristående i syfte att påvisa neurotoxicitet eller karakterisera neurotoxiska verkningar, kan de djur som inte har använts för perfusion och efterföljande histopatologi (se tabell 1) användas för specifika undersökningar av neurobeteende, neuropatologi, neurokemi eller elektrofysiologi. Resultaten från sådana undersökningar kan komplettera data som fås med den föreliggande metodens standardundersökningar (se hänvisning 1). Tilläggsundersökningar kan vara till särskilt stor nytta i fall där empiriska observationer eller de förväntade verkningarna tyder på att en kemikalies neurotoxicitet är av en specifik typ eller har ett specifikt mål. Alternativt kan de återstående djuren användas för bedömningar som bygger på metoderna för toxicitetstest med upprepad dos på gnagare.

▼B

När test enligt denna metod kombineras med test enligt andra metoder måste djurens antal vara tillräckligt för att observationskraven ska uppfyllas för båda testerna.

1.4 BESKRIVNING AV TESTMETODEN

1.4.1 **Val av djurart**

Rekommenderad gnagare är råtta. Om testet utförs med andra gnagare bör detta motiveras. Djuren bör vara unga och friska vuxna exemplar som härrör från normala laboratoriestammar. Hondjuren får inte ha fött ungar och får inte vara dräktiga. Doseringen bör i regel inledas så snart som möjligt efter avvänjningen, helst inte senare än vid sex veckors ålder och under alla omständigheter innan djuren fyllt nio veckor. När testet kombineras med andra test måste denna faktor eventuellt anpassas. Vid testets början får variationen i vikt mellan de använda djuren inte överstiga ±20 % av vardera könets medelvikt. Om ett kortvarigt test med upprepad dos utförs som inledning till ett långtidstest måste djur från samma stam och ursprung användas vid båda testerna.

1.4.2 **Förvarings- och utfodringsbetingelser**

Temperaturen i försöksdjurens utrymmen bör vara 22 °C (± 3 °C). Den relativa fuktigheten bör vara minst 30 % och ska helst inte överstiga 70 %, utom när rummet rengörs. Målvärdet bör dock vara 50–60 %. Belysningen bör vara artificiell med omväxlande 12 timmar ljus och 12 timmar mörker. Periodiska höga ljud bör minimeras. För utfodringen kan konventionellt laboratoriefoder användas, och djuren bör ha obegränsad tillgång till dricksvatten. Om tillförseln görs genom fodret, kan valet av foder kan påverkas av behovet att säkerställa en lämplig blandning med testämnet. Djuren kan inhysas individuellt eller i burar med små grupper av samma kön.

1.4.3 **Förberedelse av djuren**

Friska unga djur fördelas slumpvis i behandlings- och kontrollgrupper. Burarna placeras i sådan ordning att eventuella verkningar på grund av placeringen minimeras. Djuren förses med individuell märkning och hålls i sina burar under minst 5 dagar före försökets start så att de får acklimatisera sig till laboratoriets betingelser.

1.4.4 **Tillförselväg och beredning av doserna**

Denna testmetod är särskilt avsedd för oral tillförsel av testämnet. Den orala tillförseln kan göras genom sond, foder, dricksvatten eller kapsyler. Om andra tillförselvägar används (exempelvis via huden eller inandning) måste eventuellt de förfaranden som rekommenderas enligt metoden modifieras. Överväganden om valet av tillförselväg ska basera sig på profilen för exponering på människor och tillgänglig toxikologisk eller kinetisk information. Motivering bör ges för valet av tillförselväg liksom även en redogörelse för eventuella modifikationer av testmetodens förfaranden.

▼B

Vid behov kan testämnet upplösas eller suspenderas i en lämplig vehikel. Om möjligt bör man i första hand överväga vattenlösning eller vattensuspension, sedan oljelösning eller oljesuspension (exempelvis majsolja) och därefter eventuell lösning eller suspension i andra vehiklar. Vehikelns toxiska egenskaper måste vara kända. Dessutom bör hänsyn tas till följande egenskaper hos vehikeln: Verkningarna på absorption, distribution, metabolism eller kvarhållande av testämnet till den del dessa verkningar kan påverka testämnets toxiska egenskaper samt verkningarna på testdjurens föder- eller vattenintag eller deras näringstillstånd.

1.5 FÖRFARANDEN

1.5.1 **Djurens antal och kön**

När testet utförs fristående bör minst 20 djur (10 honor och 10 hanar) användas i varje dos- och kontrollgrupp med tanke på utvärderingen av detaljerade kliniska och funktionella observationer. Minst fem hanar och fem honor som har valts ut bland dessa tio hanar och tio honor bör vid testets slut perfuseras *in situ* och användas för detaljerad neurohistopatologi. Om endast ett begränsat antal djur i en given dosgrupp observeras med avseende på tecken på neurotoxiska verkningar bör man överväga att införliva dessa djur i det urval som perfuseras. Om testet utförs i kombination med toxicitetstest med upprepad dos, bör djurens antal vara tillräckligt för att båda testernas syfte ska uppnås. Minimiantalet djur per grupp för olika testkombinationer anges i bilaga 1. Om man planerar avlivningar under testets gång eller återhämtningsgrupper för observation av reversibilitet, varaktighet eller fördröjd start för de toxiska verkningarna efter doseringen, eller om man planerar tilläggsobservationer, bör antalet djur ökas i syfte att säkerställa tillgången till nödvändigt antal djur för observation och histopatologi.

1.5.2 **Doserings- och kontrollgrupp**

I regel bör minst tre dosgrupper och en parallell kontrollgrupp användas. Om analys av tillgängliga data tyder på att inga verkningar förväntas vid en upprepad dos på 1 000 mg per kg kroppsvikt och dag, kan ett gränstest utföras. Om det inte finns lämpliga data att tillgå kan ett inledande test utföras som hjälp för bestämning av doserna. Med undantag för behandling med testämnet bör djuren i kontrollgruppen hanteras på exakt samma sätt som djuren i dosgrupperna. Om en vehikel används för tillförsel av testämnet bör kontrollgruppen få vehikeln i den största volym som används.

1.5.3 **Tillförlitlighetskontroll**

Testningslaboratoriet bör redogöra för laboratoriets kompetens att utföra försöket samt för känsligheten hos de förfaranden som används. Redogörelsen bör ge belägg för förmågan att detektera och kvantifiera förändringar i de olika ändpunkter som rekommenderas för observation (autonoma tecken, sensorisk reaktivitet, greppstyrka och motorisk aktivitet). Information om kemikalier som orsakar olika typer av neurotoxisk respons och som kan användas som positivkontrollämnen finns i hänvisning 2–9. Historiska data kan användas förutsatt att testförfarandena till väsentliga delar förblir desamma. Periodisk uppdatering av historiska data rekommenderas. Om det testande laboratoriet gör ändringar av testförloppet eller testets förfaranden bör laboratoriet lägga fram nya data som ger belägg på förfarandenas fortsatta känslighet.

▼B

1.5.4 **Val av dos**

Dosnivåerna bör väljas med hänsyn tagen till alla tillgängliga tidigare data om observerad toxicitet och kinetik för testämnet och närbesläktade material. Den högsta dosnivån bör väljas så att den framkallar neurotoxiska verkningar eller tydliga systemiska toxiska verkningar. Därefter väljs dosnivåerna i fallande skala så att en dosrelaterad respons kan påvisas, och samtidigt så att inga påvisbara skadliga verkningar (NOAEL) kan observeras på den lägsta dosnivån. Dosnivåerna bör väljas så att primära toxiska verkningar på nervsystemet kan särskiljas från verkningar som härrör från systemisk toxicitet. Det är ofta optimalt med 2–3 intervall, och tillägg av en fjärde testgrupp är ofta att föredra framför användning av mycket breda intervall (exempelvis mer än faktorn 10) mellan dosnivåerna. Hänsyn bör tas till en eventuellt existerande skälig uppskattning av exponering på människor.

1.5.5 **Gränstest (limit test)**

Om ett test med en dosnivå på minst 1 000 mg per kroppsvikt och dag genomförs på det sätt som beskrivs här och inga neurotoxiska verkningar kan observeras, och om toxicitet inte förväntas på grundval av uppgifter om strukturellt närbesläktade ämnen, kan ett fullständigt test med tre dosnivåer anses vara överflödigt. Om det är sannolikt att människor kommer att utsättas för exponering måste eventuellt en högre dosnivå (oralt) användas vid gränstestet. För andra former av tillförsel, såsom inandning eller applicering på huden, kan testämnets fysikalkemiska egenskaper ofta utnyttjas för att indikera och begränsa den maximala exponeringsnivån. För ett test avseende akut toxicitet oralt bör gränstestets dos vara minst 2 000 mg/kg.

1.5.6 **Tillförsel av doser**

Djuren doseras dagligen med testämnet, 7 dagar i veckan under minst 28 dagar. Om doseringen görs 5 dagar i veckan eller under en kortare period bör detta motiveras. Om testämnet tillförs genom sondmatning bör hela dosen tillföras på en gång via magsond eller lämplig intubationskanyl. Den största mängd vätska som kan tillföras vid ett och samma tillfälle beror på testdjurets storlek. Volymen bör inte överskrida 1 ml per 100 g kroppsvikt. I fråga om vattenlösningar får dock volymer på upp till 2 ml per 100 g kroppsvikt användas. Med undantag för irriterande eller frätande ämnen som normalt ger kraftigare verkningar vid högre koncentrationer bör variationer i testvolym minimeras genom justering av koncentrationen, för att säkerställa en konstant volym på alla dosnivåer.

För ämnen som tillförs via fodret eller dricksvattnet är det viktigt att försäkra sig om att testämnet ges i mängder som inte stör det normala näringsupptaget eller den normala vattenbalansen. När testämnet tillförs via fodret kan man använda en konstant koncentration (ppm) eller en konstant dosnivå i förhållande till djurens kroppsvikt. Det använda alternativet måste anges. När ett ämne tillförs genom sondmatning bör dosen ges vid samma tid varje dag, och vid behov justeras dosen så att dosnivån hålls konstant i förhållande till djurens kroppsvikt. Om ett test med upprepad dos används som inledning till ett långtidstest måste samma foder användas vid båda testningarna. Om det inte är möjligt med en engångsdos vid test avseende akut toxicitet, kan dosen tillföras i mindre delar över en period som inte överskrider 24 timmar.

▼B

1.6 OBSERVATIONER

1.6.1 **Frekvens för observationer och tester**

Vid test med upprepad dos bör observationsperioden vara lika lång som doseringsperioden. Vid test avseende akut toxicitet bör djuren observeras i ytterligare 14 dagar efter doseringsperiodens slut. För djur i satellitgrupper som inte exponeras under en period efter behandlingen, bör observationerna även täcka denna period.

Observationerna bör göras tillräckligt ofta för att maximera sannolikheten för upptäckt av beteenderelaterade och/eller neurologiska avvikelser. Observationerna bör helst göras vid samma tid varje dag, med hänsyn tagen till när man förväntar sig de starkaste verkningarna efter doseringen. En översikt av frekvensen för kliniska och funktionella observationer finns i tabell 2. Om kinetiska eller andra data från tidigare studier tyder på avvikande tidpunkter för observationer, prov eller förlängda observationsperioder, bör schemat anpassas så att maximal information erhålls. Motivering bör ges för alla ändringar av schemat.

1.6.1.1 *Observationer av allmänt hälsotillstånd och mortalitet/morbiditet*

Alla djur bör observeras omsorgsfullt minst en gång per dag med avseende på hälsotillstånd och minst två gånger per dag med avseende på morbiditet och mortalitet.

1.6.1.2 *Detaljerade kliniska observationer*

Detaljerade kliniska observationer bör göras på alla djur som har valts ut för detta ändamål (se tabell 1), en gång före den första exponeringen (för att få en jämförelsegrund per djur) och därefter med olika tidsintervall beroende på testets varaktighet (se tabell 2). Detaljerade kliniska observationer av återhämtningen i satellitgrupper bör göras i slutet återhämtningsperioden. De kliniska observationerna bör göras utanför buren på en standardarena. Observationerna bör registreras omsorgsfullt med hjälp av ett poängsystem som inbegriper kriterier eller poängskalor för varje mätning. Testningslaboratoriet bör tydligt ange vilka kriterier eller skalor som har använts. Det är viktigt att säkerställa att variationerna i testbetingelserna är minimala (inte systematiskt relaterade till behandlingen) och att observationerna görs av en kompetent person som inte känner till den aktuella behandlingen.

Det rekommenderas att observationerna genomförs på ett strukturerat sätt där väldefinierade kriterier (inbegripet definition av området för normal) systematiskt tillämpas på varje djur vid varje observationstidpunkt. Området för normal bör dokumenteras på tillbörligt sätt. Alla observerade tecken bör registreras. I tillämplig mån bör även omfattningen av de observerade tecknen registreras. De kliniska observationerna bör omfatta, men inte begränsas till, förändringar av hud, päls, ögon och slemhinnor, förekomst av sekret och utsöndringar samt autonom aktivitet (tårflöde, upprest päls, pupillstorlek, ovanligt andningsmönster och/eller andning genom munnen, alla ovanliga tecken rörande urinering eller defekation samt missfärgning av urinen).

▼B

Registreringarna bör även omfatta all ovanlig respons rörande kroppsställning, aktivitetsnivå (exempelvis minskad eller ökad utforskning av standardarenan) och rörelsekoordinationen. Förändringar i gång (exempelvis vaggande gång, ataxi), kroppsställning (exempelvis kutad rygg) och respons på hantering, placering eller andra omgivningsstimuli, liksom eventuella kloniska eller toniska rörelser, konvulsioner eller skälvningar, stereotypier, (exempelvis överdrivet putsande, ovanliga huvudrörelser, upprepat cirklande) eller bisarrt beteende (exempelvis bitning eller överdrivet slickande, självstympning, bakåtgång, utstötning av ljud) eller aggressioner bör registreras.

1.6.1.3 *Funktionella observationer*

Liksom i fråga om de kliniska observationerna bör funktionella observationer göras en gång före exponeringen och därefter med tillbörlig frekvens på alla djur som har valts ut för detta ändamål (se tabell 1). Frekvensen för de funktionella observationerna beror även på testets varaktighet (se tabell 2). Utöver de observationsperioder som anges i tabell 2 bör satellitgrupper för återhämtning bli föremål för funktionella observationer så nära avlivningen som möjligt. De funktionella observationerna bör omfatta sensorisk reaktion på olika slags stimuli, exempelvis hörsel-, syn- och djupsensoriska stimuli (se hänvisning 5, 6 och 7), bedömning av greppstyrka (se hänvisning 8) och bedömning av motorisk aktivitet (se hänvisning 9). Den motoriska aktiviteten bör mätas med automatiserad utrustning som kan detektera både minskningar och ökningar av aktiviteten. Om något annat definierat system används bör detta vara kvantitativt och dess känslighet och tillförlitlighet bör påvisas. Alla apparater bör testas med avseende på tillförlitlighet över tiden och enhetliga resultat från olika apparater. Närmare uppgifter om lämpliga förfaranden finns i respektive hänvisning. Om det inte finns några data (exempelvis struktur-aktivitet, epidemiologiska data, tidigare toxikologiska test) som tyder på förmågan att framkalla neurotoxiska verkningar, bör man överväga att införliva mer specialiserade observationer av sensorisk och motorisk funktion eller inlärning och minne, för att undersöka dessa eventuella verkningar närmare. Mer information om specialiserade observationer och hur de görs finns i hänvisning 1.

Undantagsvis kan djur som uppvisar så svåra tecken på toxicitet att de i betydande mån skulle störa de funktionella observationerna utelämnas från dessa. Om djur utelämnas från de funktionella observationerna bör detta motiveras.

1.6.2 **Kroppsvikt samt foder- och vattenkonsumtion**

Vid test som varar upp till 90 dagar bör alla djur vägas minst en gång per vecka och foderkonsumtionen bör mätas (vattenkonsumtionen i de fall då testämnet tillförs i vattnet) minst varje vecka. Vid långtidstest bör alla djur vägas minst en gång per vecka under de första 13 veckorna och därefter minst var fjärde vecka. Foderkonsumtionen (vattenkonsumtionen i de fall då testämnet tillförs i vattnet) bör mätas minst varje vecka under de första 13 veckorna och därefter ungefär var tredje månad, utom om förändringar i hälsotillstånd eller kroppsvikt motiverar ett annat schema.

▼B

1.6.3 **Oftalmologi**

Vi test som varar längre än 28 dagar bör djuren, innan testämnet tillförs och vid testets slut, undersökas oftalmologiskt med ett oftalmoskop eller motsvarande utrustning. Denna undersökning bör helst omfatta alla djur men minst djuren i högdos- och kontrollgrupperna. Om ögonförändringar upptäcks, eller om kliniska tecken motiverar det, bör alla djur undersökas. Vid långtidstest bör oftalmologisk undersökning göras även när testet varat 13 veckor. Oftalmologisk undersökning behöver inte göras om det redan finns tillgång till data från tidigare gjorda test av liknande varaktighet och vid liknande dosnivåer.

1.6.4 **Hematologi och klinisk biokemi**

När testet avseende neurotoxicitet utförs i kombination med test avseende systemisk toxicitet med upprepad dos, bör hematologiska undersökningar och klinisk-biokemiska bestämningar göras enligt det som gäller för testet avseende systemisk toxicitet. Provtagningen bör göras på sådant sätt att alla potentiella verkningar på det neurologiska beteendet minimeras.

1.6.5 **Histopatologi**

Den neuropatologiska undersökningen bör utformas så att den kompletterar och utökar de observationer som har gjorts under testets *in vivo*-fas. Vävnad från minst fem djur per kön och grupp (se tabell 1 och nästa avsnitt) bör fixeras *in situ* med hjälp av allmänt erkänd perfusions- och fixeringsteknik (se kapitel 5 i hänvisning 3 och kapitel 50 i hänvisning 4). Alla observerade betydande förändringar bör registreras. Om testet utförs fristående i syfte att påvisa neurotoxicitet eller karakterisera neurotoxiska verkningar, kan återstoden av djuren användas för specifika undersökningar av neurobeteende (se hänvisning 10 och 11), neuropatologi (se hänvisning 10, 11, 12 och 13), neurokemi (se hänvisning 10, 11, 14 och 15) eller elektrofysiologi (se hänvisning 10, 11, 16 och 17) i den mån sådana undersökningar kan komplettera de förfaranden och undersökningar som beskrivs i denna metod. Återstoden kan även utnyttjas för att få fler djur för de histopatologiska undersökningarna. Dessa tilläggsförfaranden kan vara särskilt motiverade i fall där empiriska observationer eller förväntade verkningar tyder på att en kemikalies neurotoxicitet är av en specifik typ eller har ett specifikt mål (se hänvisning 2 och 3). Alternativt kan återstoden av djuren användas för rutinmässiga patologiska bedömningar enligt det som beskrivs i metoden för test med upprepad dos.

All vävnad som inbäddats i paraffin bör färgas med ett standardförfarande (såsom hematoxylin och eosin), och därefter undersökas i mikroskop. Om tecken på perifer neuropati observeras eller misstänks, bör plastinbäddade prover av perifer nervvävnad undersökas. De kliniska tecknen kan också ge indikationer på ytterligare objekt som bör undersökas eller på behovet att använda speciella färgningsförfaranden. Vägledning om ytterligare undersökningsobjekt finns i hänvisning 3 och 4. Det kan också vara motiverat med vissa specialfärgmedel i syfte att påvisa specifika typer av patologiska förändringar (se hänvisning 18).

▼B

Representativa snitt av centrala och perifera nervsystemet bör undersökas histologiskt (se kapitel 5 i hänvisning 3 och kapitel 50 i hänvisning 4). De områden som i regel ska undersökas inbegriper framhjärnan, centrum av storhjärnan, inbegripet ett snitt genom hippocampus, mitthjärnan, lillhjärnan, hjärnbryggan, förlängda märgen, ögat med synnerv och näthinna, ryggraden vid nacken och ländryggen, dorsala rotganglier, dorsala och ventrala rotfibrer, proximala ischiasnerven, proximala tibialnerven (vid knät) och tibialnervens vadmuskelförgrening. De snitt som görs av ryggraden och perifera nerver bör inbegripa diagonala, transversala och längsgående snitt. Uppmärksamhet bör fästas vid nervsystemets vaskulatur. Likaså bör man undersöka ett skelettmuskelprov, särskilt vadmuskeln. Särskild uppmärksamhet bör fästas vid sådana punkter i centrala och perifera nervsystemet som har cellulär och fibrös struktur och mönster och som man vet att särskilt påverkas av neurotoxiska ämnen.

Vägledning om neuropatologiska förändringar som typiskt uppstår efter exponering av toxiska ämnen finns i hänvisning 3 och 4. För vävnadsproverna rekommenderas en stegvis undersökning där snitt från djuren i högdosgruppen först jämförs med snitt från djuren i kontrollgruppen. Om inga neuropatologiska förändringar kan iakttas i proverna från dessa grupper behövs inga ytterligare analyser. Om neuropatologiska förändringar kan iakttas i högdosgruppen bör prover av alla potentiellt påverkade vävnader från mellandos- och lågdosgruppen kodas och undersökas.

Om tecken på neuropatologiska förändringar kan iakttas vid den kvalitativa undersökningen bör en tilläggsundersökning göras på nervsystemets alla regioner som uppvisar sådana förändringar. Snitt från djuren i alla dosgrupper, från alla potentiellt påverkade regioner bör kodas och undersökas randomiserat av personer som inte känner till koden. Frekvens och allvarlighetsgrad bör registreras för alla skador. Efter bedömning av alla regioner från alla dosgruppers djur avtäcks koderna, och en statistisk analys genomförs för utvärdering av förhållandet mellan dos och respons. För varje skada bör man beskriva exempel på olika allvarlighetsgrader.

De neuropatologiska fynden bör utvärderas med hänsyn tagen till resultaten från observationer och mätningar av beteende, liksom även till övriga data från tidigare och parallella tester av det berörda ämnets systemiska toxicitet.

2. DATA

2.1 BEHANDLING AV RESULTATEN

Data bör rapporteras individuellt. Därutöver bör alla data sammanfattas i en tabell över antalet djur i varje testgrupp eller kontrollgrupp vid testets början, antalet djur som hittats döda under testets gång eller som avlivats av hänsyn till djurens välbefinnande inbegripet avlivningstidpunkterna, antalet djur som visat tecken på toxicitet, en beskrivning av observerade tecken på toxicitet, inbegripet tidpunkten då sådana första gången upptäcktes, varaktighet och hur allvarliga de toxiska verkningarna är, antalet djur som har skador samt skadornas typ och allvarlighetsgrad.

▼B

2.2 UTVÄRDERING OCH TOLKNING AV RESULTATEN

Alla fynd bör utvärderas med avseende på förekomst, allvarlighetsgrad och korrelationen mellan neurobeteenderelaterade och neuropatologiska verkningar (även neurokemiska eller elektrofysiologiska verkningar, om tilläggsundersökningar ingår) samt alla andra skadliga verkningar som har observerats. Om möjligt bör de numeriska resultaten utvärderas genom en tillämplig och allmänt godtagbar statistisk metod. De statistiska metoderna bör fastställas vid utformningen av testet.

3. **RAPPORTERING**

3.1 TESTRAPPORT

Testrapporten ska innehålla nedan angivna uppgifter.

Testämne:

— Fysikalisk natur (inbegripet isomerism, renhet och fysikalkemiska egenskaper).

— Identifieringsdata.

Vehikel (i förekommande fall):

— Motivering för valet av vehikel.

Försöksdjur:

— Art och stam som använts.

— Djurens antal, ålder och kön.

— Ursprung, förvaringsbetingelser, acklimatisering, foder och dylikt.

— Djurens individuella vikt vid testets början.

Testbetingelser:

— Utförliga uppgifter om testämnets sammansättning och beredning av fodret, uppnådd koncentration, preparatets stabilitet och homogenitet.

— Specifikation av de tillförda doserna, inbegripet uppgifter om vehikel, volym och det tillförda materialets fysikaliska form.

— Utförliga uppgifter om hur testämnet har tillförts.

— Motivering för val av dosnivåer.

— Motivering för tillförselväg och exponeringens varaktighet.

— Omräkning av testämneskoncentrationen i foder eller vatten (ppm) till faktisk dos (mg per kg kroppsvikt och dag), om tillämpligt.

— Uppgifter om foder- och vattenkvalitet.

Observation och testförfaranden:

— Uppgifter om hur djuren i de olika grupperna varje grupp har valts ut för perfusionsundergrupperna.

— Uppgifter om poängsättningssystem, inbegripet kriterier och poängskalor för varje mätning inom de detaljerade kliniska observationerna.

▼B

— Uppgifterna om de funktionella observationerna rörande sensorisk reaktivitet på olika slags sti muli (exempelvis hörsel, syn och djupsensoriska), bedömning av greppstyrka, bedömning av motorisk aktivitet (inbegripet uppgifter om den automatiska utrustning som använts) och övriga förfaranden som använts.

— Uppgifter om oftalmologiska undersökningar och, i förekommande fall, hematologiska undersökningar och klinisk-biokemiska test med relevanta basvärden.

— Uppgifter om specifika neurobeteenderelaterade, neuropatologiska, neurokemiska eller elektrofysiologiska förfaranden.

Resultat:

— Kroppsvikt och förändringar i kroppsvikt, inbegripet kroppsvikten vid avlivningen.

— Foderkonsumtion och vattenkonsumtion, enligt det som är relevant.

— Uppgifter om toxiska reaktioner per kön och dosnivå, inklusive tecken på toxicitet eller mortalitet.

— Art, grad och varaktighet (tidpunkten för när de sätter in och hur de därefter utvecklas) för kliniska observationer (oavsett om de är reversibla eller inte).

— En detaljerad beskrivning av resultaten från alla funktionella observationer.

— Obduktionsfynd.

— En utförlig beskrivning av alla neurobeteenderelaterade, neuropatologiska, neurokemiska eller elektrofysiologiska fynd, i tillämpliga fall.

— Data om absorption och metabolism, om sådana finns tillgängliga.

— Statistisk behandling av resultaten, i tillämpliga fall.

Diskussion om resultaten:

— Information om dosrespons.

— Vilken betydelse eventuella andra toxiska verkningar har för en slutsats rörande testämnets neurotoxiska förmåga.

— Nivå där inga skadliga verkningar observeras (NOAEL).

Slutsatser:

— Ett specifikt uttalande om testämnets övergripande neurotoxicitet kan gärna ingå.

4. **HÄNVISNINGAR**

1. ”OECD Giudance Document on Neurotoxicity Testing Strategies and Test Methods”, OECD, Paris (under beredning).

2. ”Test Guidline for a Developmental Neurotoxicitu Study, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals” (under beredning).

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. P.S. Spencer och H.H. Schaumburg (1980), ”Experimental and Clinical Neurotoxicology”, red. P.S. Spencer och H.H. Schaumburg, *Williams and Wilkins,* Baltimore/London.

▼B

5. D.E. och R.B. Wallace (1980), ”Utility of the Neurological Examination in Rats”, *Acta Neurobiol. Exp.,* 40, 999–1003.

6. S.C. Gad (1982), ”A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology”, J. *Toxicol. Environ. Health,* 9, 691–704.

7. V.C. Moser, K.M. McDaniel och P.M. Phillips (1991), ”Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of amitraz”, *Toxic. Appl. Pharmacol.,* 108, 267–283.

8. O.A. Meyer, H.A. Tilson, W.C. Byrd och M.T. Riley (1979), ”A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hind-limb Grip Strength of Rats and Mice”, *Neurobehav. Toxicol., 1,* 233–236.

9. K.M. Crofton, J.L. Haward, V.C. Moser, M.W. Gill, L.W. Reirer, H.A. Tilson och R.C. MacPhail (1991), ”Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments”, *Neurotoxicol. Teratol.,* 13, 599–609.

10. H.A. Tilson och C.L. Mitchell (red.) (1992), ”Neurotoxicology Target Organ Toxicology Series”, *Raven Press,* New York.

11. L.W. Chang (red.) (1995), ”Principles of Neurotoxicology”, *Marcel Dekker,* New York.

12. B. Broxup (1991), ”Neuropathology as a screen for Neurotoxicity Assessment”, J. *Amer. Coll. Toxicol.,* 10, 689–695

13. V.C. Moser, D.C. Anthony, W.F. Sette och R.C. MacPhail (1992), ”Comparison of Subchronic Neurotoxicity of 2-Hydroxyethyl Acrylate and Acrylamide in Rats”, *Fund. Appl.Toxicol.,* 18, 343–352.

14. J.P. O'Callaghan (1988), ”Neurotypic and Gliotypic Proteins as Biochemical Markers of Neurotoxicity”, *Eurotoxicol. Teratol.,* 10, 445–452.

15. J.P. O'Callaghan och 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. D.A. Fox, H.E. Lowndes och G.G. Birkamper (1982), ”Electrophysiological Techniques in Neurotoxicology”, *Nervous System Toxicology,* red. C. L. Mitchell, *Raven Press,* New York, 299–335.

17. B.L. Johnson (1980), ”Electrophysiological Methods in neurotoxicity Testing”, *Experimental and Clinical Neurotoxicology.* red. P.S. Spencer och H. H. Schaumburg, *Williams and Wilkins Co.,* Baltimore/London, 726–742.

18. J.D. Bancroft och A. Steven (1990), ”Theory and Pratice of Histological Techniques, Chapter 17”, *Neuropathological Techniques,* red. Lowe, James och Cox, Gordon, Churchill Livingstone.

▼B

Tabell 1

Minimiantalet djur per grupp när test avseende neurotoxicitet utförs dels fristående, dels i kombination med andra test

	OLIKA UTFÖRANDEN AV TEST AVSEENDE NEUROTOXICITET			
	Separat test	I kombination med 28-dagarstest	I kombination med 90-dagarstest	I kombination med test avseende kronisk toxicitet
Sammanlagt antal djur per grupp	10 hanar och 10 honor	10 hanar och 10 honor	15 hanar och 15 honor	25 hanar och 25 honor
Antalet djur som valts ut för funktionella observationer inbegripet detaljerade kliniska observationer	10 hanar och 10 honor	10 hanar och 10 honor	10 hanar och 10 honor	10 hanar och 10 honor
Antalet djur som valts ut för perfusion *in situ* och neurohistopatologi	5 hanar och 5 honor	5 hanar och 5 honor	5 hanar och 5 honor	5 hanar och 5 honor
Antalet djur som valts ut för observationer vid toxicitetstest med upprepad dos, vid test av subkronisk eller kronisk toxicitet, för hematologisk undersökning, klinisk-biokemisk undersökning, histopatologi och dylikt, enligt respektive vägledning		5 hanar och 5 honor	10 hanar † och 10 honor †	20 hanar † och 20 honor †
Tilläggsobservationer, i förekommande fall	5 hanar och 5 honor			

† Inbegriper 5 djur som valts ut för funktionella observationer och detaljerade kliniska observationer som en del av testet avseende neurotoxicitet.

▼B

Tabell 2

Frekvens för kliniska och funktionella observationer

Typ av observationer		Testets varaktighet			
		Akut	28-dagars	90-dagars	Kronisk
För alla djur	Allmänt hälsotillstånd	Dagligen	Dagligen	Dagligen	Dagligen
	Mortalitet/morbiditet	Två gånger per dag	Två gånger per dag	Två gånger per dag	Två gånger per dag
I djur som valts ut för funktionella observationer	Detaljerade kliniska observationer	— Före den första exponeringen — Inom 8 timmar från dosering, vid uppskattad tidpunkt för högsta verkan — På dag 7 och 14 efter dosering	— Före den första exponeringen — Därefter en gång per vecka	— Före den första exponeringen — En gång under den första eller andra exponeringsveckan — Därefter en gång per månad	— Före den första exponeringen — En gång vid den första exponeringsmånadens slut — Därefter var tredje månad
	Funktionella observationer	— Före den första exponeringen — Inom 8 timmar från dosering, vid uppskattad tidpunkt för högsta verkan — På dag 7 och 14 efter dosering	— Före den första exponeringen — Under den första behandlingsveckan, så nära exponeringsperiodens slut som möjligt	— Före den första exponeringen — En gång under den första eller andra exponeringsveckan — Därefter en gång per månad	— Före den första exponeringen — En gång vid den första exponeringsmånadens slut — Därefter var tredje månad"

▼B

B.44 **HUDABSORPTION: *IN VIVO*-METOD**

1. **METOD**

Denna testmetod motsvarar OECD TG 427 (2004).

1.1 INLEDNING

Exponering för många kemikalier sker i huvudsak genom huden, medan de flesta toxikologiska studier som görs med försöksdjur gäller oral administrering. Den *in vivo*-studie av hudabsorption som beskrivs i dessa riktlinjer ger den koppling som behövs för att kunna extrapolera från orala studier vid säkerhetsbedömning efter dermal exponering.

Ett ämne måste passera ett stort antal cellager i huden innan det når blodcirkulationen. För de flesta ämnen är *stratum corneum,* hornlagret som består av döda celler, det hastighetsbestämmande lagret. Permeabiliteten genom huden beror både på hur lipofil kemikalien är och hur tjockt epidermis yttersta lager är samt på faktorer som ämnets molekylvikt och koncentration. I regel har rått- och kaninhud högre permeabilitet än human hud, medan hudpermeabiliteten hos marsvin och apor ligger närmare människans.

Metoderna för att mäta perkutan absorption kan indelas i två kategorier, *in vivo* och *in vitro*. *In vivo*-metoden kan ge god information om hudabsorption hos olika arter av försöksdjur. Under senare tid har *in vitro*-metoder utvecklats. I dessa används transport över hela eller delar av tvärsnitt av djurhud eller human hud till en vätskereservoar. *In vitro*-metoden beskrivs i en separat testmetod (1). Man bör konsultera OECD:s riktlinjer för genomförande av hudabsorptionsstudier (2) som ett stöd för valet av lämpligaste metod under givna betingelser, eftersom de innehåller detaljerade uppgifter om lämpligheten hos både *in vivo*- och *in vitro*-metoder.

Den *in vivo*-metod som beskrivs i denna metod gör det möjligt att bestämma testämnets penetration genom huden in till organismen. Tekniken har haft bred användning under många år (3)(4)(5)(6)(7). I många fall kan hudabsorptionsstudier *in vitro* vara lämpliga, men det kan finnas lägen där endast en *in vivo*-studie kan ge de data som krävs.

Fördelar med *in vivo*-metoden är att den utnyttjar fysiologiskt och metaboliskt intakta system och en art som är vanlig i många toxicitetsstudier samt att den kan modifieras för användning med andra arter. Nackdelarna är att levande djur används, behovet av att använda radioaktivmärkt material för att göra det lättare att få tillförlitliga resultat, svårigheter att fastställa den tidiga absorptionsfasen och skillnader i permeabilitet mellan den föredragna artens (råtta) hud och mänsklig hud. Djurhud är i regel mer permeabel och kan därför ge en överskattning av den humana hudabsorptionen (6)(8)(9). Frätande/korrosiva ämnen bör inte testas på levande djur.

▼B

1.2 DEFINITIONER

Oabsorberad dos: representerar det som tvättas bort från hudytan efter exponering och eventuellt finns kvar på det icke-tättslutande täckmaterialet, inbegripet eventuell dos som kan visas avdunsta från huden under exponeringen.

Absorberad dos*(in vivo)*: innefattar det som finns i urinen, i tvättvatten från buren, i avföring, i utandningsluften (om detta mäts), i blod, i vävnader (om sådana tas till vara) och i det återstående kadavret efter avlägsnande av huden på appliceringsstället.

Absorberbar dos: representerar det som finns på eller i huden efter tvätt.

1.3 PRINCIPEN FÖR TESTMETODEN

Testämnet, som helst ska vara radioaktivmärkt, appliceras på djurets rakade hud i en eller flera lämpliga doser i form av en representativ beredning som är i bruk. Testberedningen får vara i kontakt med huden under en bestämd tidsperiod under ett lämpligt täckmaterial (icke-tättslutande, halvtättslutande eller tättslutande) för att förhindra att djuret äter av testberedningen. I slutet av exponeringstiden tas täckmaterialet bort och huden rengörs med lämpligt rengöringsmedel. Täckmaterial och tvättmaterial behålls för analys och ett nytt täckmaterial appliceras. Före, under och efter exponeringsperioden hålls djuren i individuella metabolismburar och exkrementer och utandningsluft från dessa perioder samlas upp för analys. Insamlingen av utandningsluft kan uteslutas om det finns tillräckliga data som visar att inga eller få flyktiga radioaktiva metaboliter bildas. Varje studie omfattar i regel flera grupper av djur som exponeras för testberedningen. En grupp avlivas i slutet av exponeringsperioden. Andra grupper avlivas efter fastställda tidsintervall därefter (2). I slutet av provtagningstiden avlivas de återstående djuren, blod samlas in för analys, huden på applikationsstället avlägsnas för analys och kadavret analyseras med avseende på outsöndrat material. Proverna analyseras med lämpliga medel och graden av hudabsorption uppskattas (6)(8)(9).

1.4 BESKRIVNING AV METODEN

1.4.1 **Val av djurart**

Råtta är den art som oftast används, men även hårlösa stammar och arter som har hudabsorptionhastigheter som mer liknar människans kan användas (3)(6)(7)(8)(9). Unga vuxna, friska djur av samma kön (hankön är standard) av rutinmässigt använda laboratoriestammar ska användas. I början av studien bör djurens viktvariation inte överstiga ± 20 % av medelvikten. Exempelvis är hanråttor på 200 g – 250 g lämpliga, särskilt i övre delen av viktintervallet.

▼B

1.4.2 **Djurens antal och kön**

En grupp på minst fyra djur av ett kön ska användas för varje testberedning och varje schemalagd avslutningstid. Varje djurgrupp avlivas efter olika tidsintervall, t.ex. i slutet av exponeringstiden (i regel efter 6 eller 24 timmar) och vid de efterföljande tidpunkterna (t.ex. 48 och 72 timmar). Om data finns tillgängliga som visar betydande skillnader i dermal toxicitet mellan hanar och honor ska det känsligare könet väljas. Om inga sådana data finns kan någondera könet användas.

1.4.3 **Inhysning och diet**

Temperaturen i försöksdjursrummet ska vara 22 °C (± 3 °C). Den relativa luftfuktigheten ska vara minst 30 % och ska helst inte överstiga 70 % annat än vid rengöring, men målet ska vara att hålla 50–60 %. Artificiell belysning ska användas, med en sekvens på 12 timmar ljus och 12 timmar mörker. Konventionella laboratoriedieter kan användas och föda ska finnas fritt tillgänglig tillsammans med obegränsat med dricksvatten. Under studien och helst även under acklimatiseringen ska djuren inhysas enskilt i metabolismburar. Eftersom spill av föda och vatten skulle äventyra resultaten ska risken för spill minimeras.

1.4.4 **Förberedelse av djuren**

Djuren märks för att möjliggöra identifiering av individerna och hålls i sina burar i minst fem dagar innan studien inleds för att de ska acklimatisera sig till laboratoriebetingelserna.

Efter acklimatiseringsperioden, och ungefär 24 timmar före dosering, rakas ett hudområde på djuren runt hals och rygg. Eftersom permeabilitetsegenskaperna för skadad hud skiljer sig från dem hos intakt hud bör man undvika att skada huden. Efter rakning och ungefär 24 timmar innan testämnet appliceras på huden (se avsnitt 1.4.7) ska hudytan torkas av med aceton för att avlägsna sebum. En kompletterande tvätt med tvål och vatten rekommenderas inte, eftersom eventuella tvålrester kan främja absorption av testämne. Området måste vara tillräckligt stort för att det ska gå att göra en tillförlitlig beräkning av den absorberade mängden testkemikalie per cm^2 hud, helst minst 10 cm^2. Detta område är praktiskt möjligt att ha på råttor med kroppsvikten 200–250 g. Efter förberedelsen återförs djuren till metabolismburarna.

1.4.5 **Testämne**

Testämnet är den entitet vars penetrationsegenskaper ska studeras. Helst ska testämnet vara radioaktivmärkt.

1.4.6 **Testberedningen**

Beredningen av testämne (t.ex. rent, utspätt eller formulerat material innehållande testkemikalien som appliceras på huden) ska vara detsamma (eller en rimlig ersättning) som det som människor eller andra målarter kan exponeras för. Alla avvikelser från den beredning som ”är i bruk” måste motiveras. Vid behov löses eller suspenderas testämnet i en lämplig vehikel. För andra vehikler än vatten ska absorptionsegenskaper och potentiella interaktioner vara kända.

▼B

1.4.7 **Applicering på huden**

Ett appliceringsställe med en viss yta definieras på hudytan. En känd mängd av testberedningen appliceras sedan jämnt på detta ställe. Mängden ska normalt efterlikna den potentiella exponering människor utsätts för, i regel 1–5 mg/cm^2 för ett fast ämne och upp till 10 µl/cm^2 för vätskor. Alla andra mängder ska motiveras av de förväntade användningsbetingelserna, studiens syfte eller testberedningens fysikaliska egenskaper. Efter applicering ska det behandlade stället skyddas från putsning. Ett exempel på en typisk anordning visas i figur 1. Normalt skyddas appliceringsstället med ett täckmaterial som inte är tättslutande (t.ex. ett permeabelt skydd av nylonväv). För mycket små mängder bör dock appliceringsstället täckas tätt. Om avdunstning av halvflyktiga testämnen minskar upptagshastigheten av testämnet i oacceptabel omfattning (se även avsnitt 1.4.10, första stycket) måste det avdunstade ämnet fångas i ett träkolsfilter som täcker appliceringsanordningen (se figur 1). Det är viktigt att anordningen inte skadar huden och inte heller absorberar eller reagerar med testberedningen. Djuren återförs till individuella metabolismburar för uppsamling av exkrementer.

1.4.8 **Varaktighet för exponering och provtagning**

Exponeringens varaktighet är tidsintervallet mellan applicering och avlägsnande av testberedningen genom tvätt av huden. Exponeringsperioden ska vara relevant, i regel 6 eller 24 timmar, i förhållande till den förväntade humana exponeringstiden. Efter exponeringsperioden hålls djuren i metabolismburarna fram till den schemalagda avslutningen. Djuren ska observeras med regelbundna intervall med avseende på tecken på toxicitet/onormala reaktioner under hela studieperioden. I slutet av exponeringsperioden ska den behandlade huden granskas så att man kan hitta eventuella synliga tecken på irritation.

Metabolismburarna ska tillåta separat uppsamling av urin och avföring under hela studien. De ska också tillåta uppsamling av ^{14}C-koldioxid och flyktiga ^{14}C-kolföreningar för analys vid produktion som överstiger 5 %. Urin, avföring och infångningsvätskor (t.ex. med ^{14}C-koldioxid och flyktiga ^{14}C-föreningar) ska samlas upp enskilt från varje grupp vid varje provtagningstillfälle. Om det finns tillräckliga data för att man ska kunna utgå ifrån att inga eller mycket lite flyktiga radioaktiva metaboliter bildas går det att använda öppna burar.

Exkrementer samlas upp under exponeringsperioden, upp till 24 timmar efter den initiala hudkontakten och sedan dagligen till och med försökets sista dag. Tre extra uppsamlingsintervall räcker i regel, men syftet med testberedningen eller befintliga kinetiska data kan ge vid handen att andra eller ytterligare tidpunkter är lämpliga för studien.

I slutet av exponeringsperioden tas skyddsanordningen bort från varje djur och sparas separat för analys. Den behandlade huden på alla djur ska tvättas minst 3 gånger med rengöringsmedel med lämpliga svabbar. Det är viktigt att undvika att kontaminera andra delar av kroppen. Rengöringsmedlet ska vara representativt för normal hygien, t.ex. en tvållösning i vatten. Slutligen ska huden torkas. Alla svabbar och allt tvättvatten ska sparas för analys. Ett nytt täckmaterial appliceras för att skydda det behandlade stället på djur som ingår i grupper med senare provtagningstidpunkter innan de återförs till sina enskilda burar.

▼B

1.4.9 **Avslutningsförfaranden**

För varje grupp ska de enskilda djuren avlivas på den schemalagda tidpunkten och blodprov tas för analys. Skyddsanordningen eller täckmaterialet avlägsnas för analys. Huden från appliceringsstället och en motsvarande yta av odoserad, rakad hud tas från varje djur för separat analys. Appliceringsstället kan delas upp för att skilja hornlagret från underliggande epidermis så att mer information erhålls om testkemikaliens fördelning. Bestämningen av fördelningen under en viss tid efter exponeringsperioden bör ge en indikation om vad som händer med eventuell testkemikalie i hornlagret. För att underlätta uppdelningen av huden (efter att djuret har genomgått sluttvätt och avlivats) tas alla skyddsanordningar bort. Huden på appliceringsstället, med en omgivande ring av hud, skärs ut från råttan och nålas upp på en platta. En remsa häftande tejp appliceras på hudytan med ett varsamt tryck och tejpen tas bort tillsammans med en del av hornlagret. Tejpremsor appliceras successivt tills tejpen inte längre fäster vid hudytan, då hela hornlagret har avlägsnats. För varje djur kan remsorna slås samman i en enda behållare. Till denna behållare sätts en vävnadsnedbrytare för att lösa upp hornlagret. Eventuell potentiell målvävnad kan avlägsnas för separat mätning innan det återstående kadavret analyseras med avseende på absorberad kadaverdos. De enskilda kadavren ska sparas för analys. Vanligen räcker en analys av totalinnehållet. Målorgan kan avlägsnas för separat analys (om andra studier tyder på att detta bör göras). Urin i blåsan vid den schemalagda tidpunkten för avlivning ska läggas till de tidigare uppsamlade urinproven. Efter uppsamling av exkrementer från metabolismburarna vid den schemalagda avlivningstiden ska burarna och tillhörande infångningsanordningar tvättas med lämpligt lösningsmedel. Även annan potentiellt kontaminerad utrustning ska analyseras.

1.4.10 **Analys**

Adekvat återvinning av radioaktiviteten (dvs. ett medelvärde på 100 ± 10 % av all radioaktivitet) ska uppnås i alla studier. Återvinning utöver detta intervall måste motiveras. Mängden av den administrerade dosen i varje prov analyseras med lämpliga vedertagna förfaranden.

De statistiska beräkningarna ska inbegripa ett mått på variansen för replikaten för varje applicering.

2. **DATA**

Följande mätningar ska göras för varje djur, vid varje provtagningstillfälle för testkemikalien och/eller metaboliter. Utöver individdata ska data grupperade efter provtagningstidpunkter rapporteras som medelvärden:

— Kvantitet i skyddsanordningen.

— Kvantitet som kan avlägsnas från huden.

— Kvantitet i/på huden som inte kan tvättas bort från denna.

▼B

— Kvantitet i blodprover.

— Kvantitet i exkrementer och i utandningsluft (om sådana data finns).

— Återstående kvantitet i kadavret och i eventuella organ som har avlägsnats för separat analys.

Kvantiteten av testämnet och/eller metaboliter i exkrementer, utandningsluft, blod och kadaver gör det möjligt att bestämma den totala mängd som har absorberats vid varje tidpunkt. Även en beräkning av mängden testkemikalie som absorberats för varje cm^2 hud som exponerats för testämnet kan göras.

3. **RAPPORTERING**

3.1 FÖRSÖKSRAPPORT

Testrapporten måste avspegla de krav som ställs enligt försöksprotokollet, inbegripet en motivering för det använda testsystemet. Rapporten ska innehålla följande information:

Testämne:

— Identifieringsdata (t.ex. CAS-nummer, om detta är känt; källa; renhet (radiokemisk renhet); kända orenheter; satsnummer).

— Fysikaliskt tillstånd, fysikalkemiska egenskaper (t.ex. pH, flyktighet, löslighet, stabilitet, molekylvikt och log P_{ow}).

Testberedning:

— Formulering och motivering av användning.

— Detaljerade uppgifter om testberedningen, applicerad mängd, uppnådd koncentration, vehikel, stabilitet och homogenitet.

Försöksdjur:

— Använd stam/art.

— Djurens antal, ålder och kön.

— Källa för djuren, inhysningsbetingelser osv.

— De enskilda djurens vikt då försöket påbörjas.

Försöksförhållanden:

— Detaljerade uppgifter om administrering av testberedningen (appliceringsställe, bestämningsmetoder, tättslutande/icketättslutande täckmaterial, volym, extraktion, detektion).

— Detaljerade uppgifter om födo- och vattenkvalitet.

Resultat:

— Eventuella tecken på toxicitet.

— Absorptionsdata i tabellform (uttryckt som hastighet, mängd eller procentandel).

▼B

— Uppgifter om total återvinning från försöket.

— Tolkning av resultaten, jämförelse med tillgängliga data för hudabsorption av testföreningen.

Diskussion av resultaten.

Slutsatser.

4. **HÄNVISNINGAR**

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.

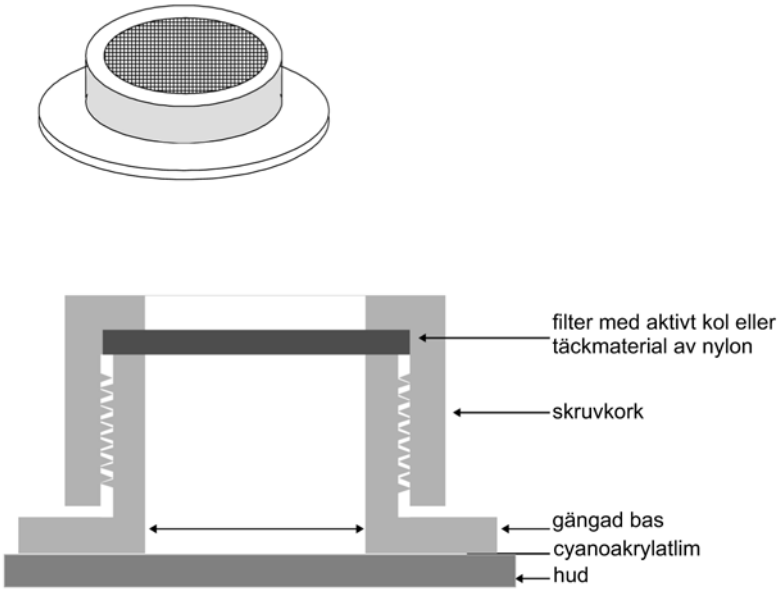
8. Bronaugh RL, Wester RC, Bucks D, Maibach HI and Sarason R (1990) *In vivo* percutaneous absorption of fragrance ingredients in reshus monkeys and humans. *Fd. Chem. Toxic.* 28, 369–373.

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

Ett exempel på en typisk anordning som används för att definiera och skydda appliceringsstället på huden vid hudabsorptionsstudier *in vivo*.



▼B

B.45. **HUDABSORPTION: *in vitro*-METOD**

1. **METOD**

Denna testmetod motsvarar OECD TG 428 (2004).

1.1 INLEDNING

Denna metod har utformats för att ge information om absorption av ett testämne som appliceras på utskuren hud. Den kan antingen kombineras med metoden för hudabsorption *in vivo* (1) eller genomföras separat. Det rekommenderas att OECD:s riktlinjedokument för genomförande av hudabsorptionsstudier (2) konsulteras som ett stöd för utformningen av studier som bygger på denna metod. Riktlinjedokumentet har tagits fram för att underlätta urvalet av *in vitro*-förfaranden för användning under särskilda betingelser, för att garantera att de resultat som erhålls med denna metod blir tillförlitliga.

Metoderna för att mäta hudabsorption och dermal leverans kan indelas i två kategorier: *in vivo* och *in vitro. In vivo*-metoder för hudabsorption är väl etablerade och ger farmakokinetisk information i ett urval av djurarter. En *in vivo*-metod beskrivs separat i en annan testmetod (1). *In vitro*-metoder har också använts under många år för att testa hudabsorption. Formella valideringsstudier av *in vitro*-metoder som omfattas av denna testmetod har inte gjorts, men OECD-experter enades 1999 om att tillräckligt med data hade utvärderats för att stödja *in vitro*-metoden (3). Detaljerade uppgifter som ytterligare stödjer detta, inbegripet ett betydande antal direktjämförelser av *in vitro*- och *in vivo*-metoder, finns i riktlinjedokumentet (2). Det finns ett antal monografier som innehåller översikter över detta ämne och ger en detaljerad bakgrund till användningen av en *in vitro*-metod (4)(5)(6)(7)(8)(9)(10)(11)(12). *In vitro*-metoder mäter diffusionen av kemikalier in i och genom huden till en vätskereservoar, och det går använda icke-viabel hud för att mäta endast diffusion eller färsk, metaboliskt aktiv hud för att samtidigt mäta diffusion och metabolism i huden. Sådana metoder har särskilt funnit användning för att jämföra leveransen av kemikalier in i och genom huden från olika formuleringar och kan också ge användbara modeller för hudabsorption hos människa.

In vitro-metoden är inte alltid tillämplig för alla situationer och för alla kemikalieklasser. Den kan gå att använda för en initial kvalitativ utvärdering av hudpenetrationen. I vissa fall kan det vara nödvändigt att följa upp denna utvärdering med *in vivo*-data. Riktlinjedokumentet (2) bör konsulteras för ytterligare information om situationer där *in vitro*-metoden skulle vara lämplig. Mer detaljerade uppgifter som stöd för beslutet finns i (3).

Denna metod presenterar allmänna principer för att mäta hudabsorption och leverans av ett testämne med hjälp av utskuren hud. Hud från många däggdjursarter, inbegripet människa, kan användas. Hudens permeabilitetsegenskaper bibehålls efter utskärning, eftersom den huvudsakliga diffusionsbarriären är det icke-viabla hornlagret, *stratum corneum;* aktiv transport genom huden har inte påvisats. Huden har visats kunna metabolisera vissa kemikalier under hudabsorption (6), men denna process är inte hastighetsbegränsande med avseende på faktisk absorberad dos, även om den kan påverka naturen hos det material som kommer in i blodbanan.

▼B

1.2 DEFINITIONER

Oabsorberad dos: representerar det som tvättas bort från hudytan efter exponering och eventuellt finns kvar på det icke-tättslutande täckmaterialet, inbegripet eventuell dos som kan visas avdunsta från huden under exponeringen.

Absorberad dos *(in vitro)*: massan av testämne som når mottagarvätskan eller den systemiska cirkulationen inom en given tidsperiod.

Absorberbar dos *(in vitro)*: representerar det som finns kvar på eller i huden efter tvättning.

1.3 PRINCIPEN FÖR TESTMETODEN

Testämnet, som kan vara radioaktivmärkt, appliceras på ytan av ett hudprov som skiljer två kammare åt i en diffusionscell. Kemikalien finns kvar på huden under en fastställd tid och under fastställda betingelser innan den avlägsnas med ett lämpligt rengöringsförfarande. Mottagarvätskan provtas vid tidpunkter under hela försöket och analyseras med avseende på testkemikalie och/eller metaboliter.

Om metaboliskt aktiva system används kan metaboliter av testkemikalien analyseras med lämpliga metoder. I slutet av försöket kvantifieras fördelningen av testkemikalien och dess metaboliter, om sådana förekommer.

Under lämpliga betingelser, såsom beskrivs i denna metod och i riktlinjedokumentet (2), mäts absorptionen av en testkemikalie under en given tidsperiod genom analys av en mottagarvätska och av den behandlade huden. Det testämne som återstår i huden ska betraktas som absorberat om det inte kan visas att absorptionen kan bestämmas utifrån enbart värden för receptorvätskan. Analys av övriga komponenter (material som tvättas bort från huden och som finns kvar i hudlagren) gör ytterligare utvärdering av data möjlig, inbegripet total fördelning av testämne och procentandel återvunnet testämne.

Resultat för relevanta referenskemikalier ska finnas tillgängliga och överensstämma med publicerad litteratur om den använda metoden för att visa testsystemets prestanda och tillförlitlighet på det laboratorium som genomför försöket. Detta krav kan uppfyllas genom att en lämplig referenskemikalie (helst ett ämne vars lipofilicitet ligger nära testämnets) testas samtidigt med testämnet eller genom att adekvata historiska data tillhandahålls för ett antal referensämnen med olika lipofilicitet (t.ex. koffein, bensoesyra och testosteron).

1.4 BESKRIVNING AV TESTMETODEN

1.4.1 **Diffusionscell**

En diffusionscell består av en givarkammare och en mottagarkammare mellan vilka huden placeras (ett exempel på en typisk utformning finns i figur 1). Cellen ska ge en god förslutning runt huden, möjliggöra enkel provtagning och en god blandning av den mottagarlösning som är i kontakt med hudens undersida samt god temperaturkontroll av cellen och dess innehåll. Diffusionsceller av både statisk typ och genomflödestyp är godtagbara. Normalt lämnas givarkammaren öppen under exponering för en begränsad dos av en testberedning. Vid applicering av en obegränsad dos och i vissa fall även av begränsade doser kan givarkammaren inneslutas.

▼B

1.4.2 **Mottagarvätska**

Föredraget används en fysiologiskt anpassad mottagarvätska, även om andra vätskor kan användas om detta är motiverat. Mottagarvätskans exakta sammansättning ska anges. Det ska visas att testkemikaliens löslighet i mottagarvätskan är rimlig så att vätskan inte fungerar som en barriär för absorption. Mottagarvätskan får inte heller skada hudberedningen. I ett genomflödessystem får flödeshastigheten inte förhindra diffusion av testämnet in i mottagarvätskan. I ett statiskt system ska vätskan vara under ständig omrörning och provtas regelbundet. Om metabolism studeras måste receptorvätskan kunna hålla huden viabel under hela försöket.

1.4.3 **Hudberedningar**

Människo- eller djurhud kan användas. Användning av human hud begränsas är föremål för nationella och internationella etiska hänsynstaganden och begränsningar. Viabel hud är att föredra, men icke-viabel hud kan användas om det kan visas att den inte är skadad. Både epidermala membran (separerade med hjälp av enzymer, värme eller kemikalier) eller hud med anpassad tjocklek (i regel 200–400 μm tjock) preparerad med dermatom är godtagbara. Hud med full tjocklek kan användas, men alltför tjock hud (cirka > 1 mm) bör undvikas, om inte detta särskilt krävs för bestämning av testkemikalien i hudlagren. Valet av art, anatomisk placering och preparationsteknik måste motiveras. Godtagbara data för minst fyra replikat per testberedning krävs.

1.4.4 **Hudberedningens integritet**

Huden måste prepareras korrekt. Olämplig hantering kan leda till att hornlagret skadas. Därför måste man kontrollera att den preparerade huden inte är skadad. När hudmetabolism undersöks ska den nyutskurna huden användas så snart som möjligt och under betingelser som är kända för att främja metabolisk aktivitet. Som en allmän vägledning kan sägas att nyutskuren hud ska användas inom 24 timmar, men den godtagbara lagringsperioden kan variera beroende på vilket enzymsystem som är involverat i metaboliseringen och på lagringstemperaturen (13). När hudberedningar har lagrats före användning ska det finnas belägg för att barriärfunktionen är bibehållen.

1.4.5 **Testämne**

Testämnet är den entitet var penetrationsegenskaper studeras. Helst ska testämnet vara radioaktivmärkt.

1.4.6 **Testberedning**

Beredningen av testämne (t.ex. rent, utspätt eller formulerat material innehållande testkemikalien som appliceras på huden) ska vara detsamma (eller en rimlig ersättning) som det som människor eller andra målarter kan exponeras för. Alla avvikelser från den beredning som ”är i bruk” måste motiveras.

▼B

1.4.7 **Testämneskoncentration och testämnesformuleringar**

Normalt används mer än en koncentration av testämnet så att den övre gränsen för potentiell human exponering ligger inom koncentrationsintervallet. Likaledes bör man överväga att testa ett urval av typiska formuleringar.

1.4.8 **Applicering på huden**

Under normala betingelser för human exponering för kemikalier är doserna vanligen begränsade. Därför ska en applicering som efterliknar human exponering användas, normalt 1–5 mg/cm^2 hud för ett fast ämne och upp till 10 µl/cm^2 för en vätska. Mängden ska motiveras av de förväntade användningsbetingelserna, studiens syften och testberedningens fysikaliska egenskaper. Exempelvis kan appliceringen på hudytan vara obegränsad om stora volymer per enhetsyta appliceras.

1.4.9 **Temperatur**

Passiv diffusion av kemikalier (och därmed deras hudabsorption) påverkas av temperaturen. Diffusionskammaren och huden ska hållas vid en konstant temperatur som ligger nära den normala hudtemperaturen på 32 °C ± 1 °C. Olika cellutföranden kräver olika temperatur på vattenbad eller uppvärmningsblock för att säkerställa att mottagarvätskan/huden hålls vid sin fysiologiska norm. Fuktigheten ska helst ligga mellan 30 och 70 %.

1.4.10 **Varaktighet för exponering och provtagning**

Huden kan exponeras för testberedningen under hela försökets gång eller under kortare tider (t.ex. för att efterlikna en särskild typ av human exponering). Överflödig testberedning ska tvättas bort från huden med lämpligt rengöringsmedel och tvättvattnet ska samlas upp för analys. Förfarandet för att avlägsna testberedningen beror på de förväntade användningsbetingelserna och ska motiveras. En provtagningsperiod på 24 timmar krävs normalt för att tillåta adekvat karakterisering av absorptionsprofilen. Eftersom hudens integritet kan börja försämras efter 24 timmar bör provtagningstidpunkterna normalt inte ligga efter 24 timmar. För testämnen som tränger igenom huden snabbt kan detta vara onödigt, men för testämnen som tränger igenom huden långsamt kan längre tider krävas. Provtagningsfrekvensen för mottagarvätska ska vara sådan att det går att återge testämnets absorptionsprofil grafiskt.

1.4.11 **Avslutningsförfaranden**

Alla testsystemets komponenter ska analysers och återvinningen bestämmas. Detta inbegriper givarkammaren, tvättvattnet från hudberedningen, hudberedningen samt mottagarvätska och mottagarkammare. I vissa fall kan huden delas upp i den exponerade hudytan och hudytan under cellens fläns samt i hornlager-, epidermis- och dermisfraktioner för separat analys.

1.4.12 **Analys**

Adekvat återvinning av radioaktiviteten ska uppnås i alla studier (målet bör vara ett medelvärde på 100 ± 10 % av radioaktiviteten, och alla avvikelser ska motiveras). Mängden testämne i mottagarvätskan och hudberedningen samt i tvättvätskan från hudyta och apparatur ska analyseras med lämplig teknik.

▼B

2. **DATA**

Analysen av mottagarvätskan, fördelningen av testkemikalien i testsystemet och absorptionsprofilen med tid ska presenteras. Då begränsade doser används ska den mängd som tvättas bort från huden, den mängd som finns i huden (och i de olika hudlagren om detta har analyserats) samt den mängd som finns i mottagarvätskan (hastighet samt mängd eller procentandel av applicerad dos) beräknas. Hudabsorption uttrycks ibland endast som data för mottagarvätskan. Om testämnet finns kvar i huden i slutet av försöket kan dock den mängden behöva inkluderas i den totala absorberade mängden (se stycke 66 i hänvisning 3). Om en obegränsad dos har använts vid exponeringen kan det gå att beräkna en permeabilitetskonstant (Kp) med hjälp av erhållna data. Under de senare betingelserna är procentandelen absorberat testämne inte av betydelse.

3. **RAPPORTERING**

3.1 FÖRSÖKSRAPPORT

Försöksrapporten måste avspegla de krav som ställs enligt försöksprotokollet, inbegripet en motivering för det använda testsystemet. Rapporten måste innehålla följande information:

Testämne:

— Fysikaliskt tillstånd, fysikalkemiska egenskaper (minst molekylvikt och log P_{ow}) och renhet (radiokemisk renhet).

— Identifieringsdata (t.ex. satsnummer).

— Löslighet i mottagarvätskan.

Testberedning:

— Formulering och motivering för användningen.

— Homogenitet.

Försöksförhållanden:

— Källor till huden och ursprungsplacering på kroppen, lagringsbetingelser före användning, eventuell förbehandling (rengöring, antibiotikabehandling osv.), mätningar av hudens integritet, metabolisk status, motivering av användningen.

— Cellutformning, mottagarvätskans sammansättning, mottagarvätskans flödeshastighet eller provtagningstider och provtagningsförfaranden.

— Detaljerade uppgifter om testberedningen och kvantifiering av applicerad dos.

— Exponeringens varaktighet.

— Detaljerade uppgifter om avlägsnande av testberedningen från huden, t.ex. tvätt av huden.

— Detaljerade uppgifter om analys av huden och eventuella delningsmetoder som har använts för att påvisa fördelning i huden.

▼B

— Förfaranden för tvätt av cell och utrustning.

— Analysmetoder, extraktionstekniker, detektionsgränser och validering av analysmetoder.

Resultat:

— Total återvinning från försöket (applicerad dos ≡ tvättvatten från huden + huden + mottagarvätskan + tvättvatten från cellen).

— Återvinning från varje cell och varje kammare i tabellform.

— Absorptionsprofil.

— Absorptionsdata i tabellform (uttryckt som hastighet, mängd eller procentandel).

Diskussion av resultaten.

Slutsatser.

4. **HÄNVISNINGAR**

1. Testmetod B.44. Hudabsorption: *in vivo*-metod.

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 BW and Reifenrath WG. (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 Chem Tox, 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

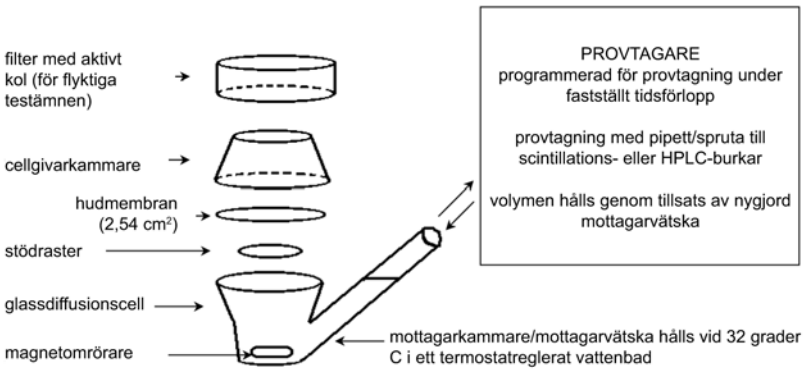
11. Schaefer H and Redelmeier TE. (1996). Skin barrier: principles of percutaneous absorption. Karger, Basel.

12. Roberts MS and Walters KA. (1998). Dermal absorption and toxicity assessment. Marcel Dekker, New York.

13. Jewell, C., Heylings, JR., Clowes, HM. And Williams, FM. (2000). Percutaneous absorption and metabolism of dinitrochlorobenzene in vitro. Arch Toxicol 74: 356–365.

Figur 1

Ett exempel på en typisk utformning av en statisk diffusionscell för perkutana absorptionsstudier *in vitro.*



▼M3

B.46. *IN VITRO*-HUDIRRITATION: TESTMETOD MED REKONSTRUERAD HUMAN HUD

INLEDNING

1. Hudirritation betyder att det uppstår reversibel skada på huden efter applicering av en testkemikalie i upp till fyra timmar, enligt definitionen i Förenta nationernas globalt harmoniserade system för klassificering och märkning av kemikalier (FN:s GHS) och Europaparlamentets och rådets förordning (EG) nr 1272/2008 av den 16 december 2008 om klassificering, märkning och förpackning av ämnen och blandningar (CLP-förordningen) (1) (3). Denna testmetod innebär ett *in vitro*-förfarande som kan användas för identifiering av faror med irriterande kemikalier (ämnen och blandningar) enligt FN:s GHS och EU:s CLP-kategori 2 (1) (2) (3). I EU och andra regioner som inte har antagit FN:s frivilliga GHS-kategori 3 (svagt irriterande ämnen) kan testmetoden även användas för att identifiera icke-klassificerade kemikalier, dvs. ”ingen kategori” enligt FN:s GHS och CLP-förordningen (1) (3). Testmetoden kan användas för att fastställa kemikaliers hudirriterande verkan som ett fristående ersättningstest för *in vivo*-testning för hudirritation som en del av en strategi för stegvis testning (4 och kapitel B.4 i denna bilaga).

2. Bedömningen av hudirritation har vanligtvis inneburit användning av laboratoriedjur (OECD:s testriktlinje 404, kapitel B.4 i denna bilaga) (4). På grund av frågor rörande djurens välbefinnande reviderades metod B.4 år 2004 och med den kan man fastställa hudkorrosion/hudirritation genom att tillämpa en stegvis teststrategi med validerade *in vitro*- och *ex vivo*-metoder, och på så sätt undvika smärta och lidande hos djur. Tre validerade *in vitro*-testmetoder har antagits som OECD:s testriktlinjer 430, 431 och 435 (5) (6) (7) och två av dem som kapitel B.40 och B.40a i denna bilaga, för att användas för korrosivitetsdelen i den stegvisa teststrategin i B.4 eller OECD:s testriktlinje 404 (4).

3. Denna testmetod gäller hudirritation som en slutpunkt för människa. Den baserar sig på rekonstruerad human hud (RhE) där produkten (användning av icke-transformerade keratinocyter i epidermis med humant ursprung som cellkälla och användning av representativ vävnad och cytoarkitektur) har mycket liknande biokemiska och fysiologiska egenskaper som den humana överhuden (epidermis). Denna testmetod omfattar också en uppsättning prestandastandarder (tillägg 2) för bedömning av liknande och modifierade RhE-baserade metoder som utvecklats av EC-ECVAM (8), i enlighet med principerna i OECD:s riktlinjedokument nr 34 (9).

4. Det finns tre validerade metoder som följer denna testmetod. Förvalidering, optimering och valideringsstudier har genomförts för en *in vitro*-metod (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) med användning av en RhE-modell som finns kommersiellt tillgänglig som EpiSkin™ (utsedd till validerad referensmetod). Två andra kommersiellt tillgängliga *in vitro*-hudirritationsmetoder enligt RhE-modellen har enligt prestandastandardbaserad validering visat liknande resultat som den validerade referensmetoden (21) – metoderna är EpiDerm™ SIT (EPI-200) och SkinEthic™ RHE (22).

▼M3

5. Innan en föreslagen liknande eller modifierad *in vitro*-metod enligt RhE-modell annan än den validerade referensmetoden, EpiDerm™ SIT (EPI-200) eller SkinEthic™ RHE, kan användas för lagenliga ändamål bör metodens tillförlitlighet, relevans (exakthet) och begränsningar för den föreslagna användningen bestämmas för att säkerställa att metoden kan anses vara liknande den validerade referensmetoden, i enlighet med kraven i prestandastandarder som anges i denna testmetod (tillägg 2). Det är också rekommendabelt att studera OECD:s bakgrundsdokument rörande *in vitro*-hudirritationstestning innan man utvecklar och validerar en liknande eller modifierad *in vitro*-metod enligt RhE-modell och lämnar in den för godkännande (23).

DEFINITIONER

6. Definitioner av begreppen finns i tillägg 1.

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN OCH BEGRÄNSNINGAR

7. En begränsning av testmetoden, såsom det påvisas i valideringsstudien (16), är att man inte kan klassificera kemikalier för FN:s frivilliga GHS-kategori 3 (svagt irriterande ämnen) (1). När metoden används som ett partiellt ersättningstest kan det krävas uppföljande *in vivo*-testning för att få en fullständig bild av hudirritationspotentialen (4 och kapitel B.4 i denna bilaga). Användningen av human hud är föremål för nationella och internationella etiska överväganden och begränsningar.

8. Denna testmetod hänför sig till *in vitro*-hudirritationskomponenten i den stegvisa testningsstrategin för B.4 (OECD:s testriktlinje 404) om hudkorrosion/hudirritation (4). Den ger inte tillräcklig information om hudkorrosion, men här bör noteras att B.40a (OECD:s testriktlinje 431) om hudkorrosion baserar sig på samma RhE-testsystem, om än med användning av ett annat protokoll (kapitel B.40a). Denna metod baserar sig på RhE-modeller med användning av humana keratinocyter, som därför representerar *in vitro*-målorganet hos den art det gäller. Metoden täcker dessutom direkt det inledande steget hos den inflammatoriska kaskaden/funktionsmekanismen (cellskada och vävnadsskada som leder till lokaliserat trauma) som inträffar vid irritation *in vivo*. En omfattande mängd olika kemikalier har testats vid den validering som ligger till grund för denna testmetod och valideringsstudiens empiriska databas uppgick till totalt 58 kemikalier (16) (18) (23). Tillämpligheten omfattar fasta ämnen, vätskor, halvfasta ämnen och vaxer. Vätskorna kan vara vattenbaserade eller icke-vattenbaserade och de fasta ämnena kan vara vattenlösliga eller icke-vattenlösliga. Fasta ämnen ska alltid när det är möjligt malas ned till fint pulver före appliceringen, och ingen annan beredning behövs. Gaser och aerosoler har ännu inte bedömts genom valideringsstudier (24). Det är tänkbart att de kan testas med RhE-teknik, men den aktuella testmetoden ger inte möjlighet att testa gaser och aerosoler. Det bör också noteras att mycket färgstarka kemikalier kan störa cellviabilitetsmätningarna och för dem krävs användning av anpassade kontrollgrupper för korrigering (se punkterna 24–26).

9. En enda testomgång med tre vävnadsbitar bör vara tillräcklig för en testkemikalie förutsatt att klassificeringen är otvetydig. I fall av gränsresultat, såsom icke-konkordanta mätningar av vävnadsbitarna och/eller genomsnittlig procentuell viabilitet lika med 50 ± 5 %, bör man överväga en andra testomgång, och en tredje omgång om resultaten mellan de två första omgångarna är diskordanta.

▼M3

PRINCIP FÖR TESTMETODEN

10. Testkemikalien appliceras lokalt på en tredimensionell RhE-modell som består av icke-transformerade epidermala keratinocyter av humant ursprung som har odlats till att bilda en starkt differentierad modell av human hud i flera lager. Den består av ordnade lager: basalt lager, taggcellslager och granulärt lager samt ett hornlager i flera skikt som innehåller intercellulära lamellager som representerar de huvudsakliga lipidklasser som motsvarar dem som förekommer *in vivo*.

11. Kemiskt inducerad hudirritation, som manifesterar sig som hudrodnad och ödem, är resultatet av en rad händelser som börjar med penetration av hornlagret (*stratum corneum*) och skador på de underliggande lagren av keratinocyter. De döende keratinocyterna avger mediatorer som inleder den inflammatoriska kaskaden som påverkar cellerna i huden, särskilt stroma- och endotelceller. Utvidgningen och den ökade permeabiliteten hos endotelcellerna ger upphov till den observerade hudrodnaden och det observerade ödemet (24). Den RhE-baserade metoden mäter kaskadens initierande händelser.

12. I RhE-modeller mäts cellviabiliteten genom enzymatisk omvandling av det vitala färgämnet MTT [(3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazoliumbromid, tiazolylblått, CAS-nummer 298-93-1)], till ett blått formazansalt som mäts kvantitativt efter det att vävnaderna har extraherats (25). Irriterande kemikalier identifieras genom deras förmåga att minska cellviabiliteten under definierade gränsvärden (dvs. ≤ 50 % för kategori 2 enligt FN:s GHS och CLP-förordningen). Beroende på den rättsliga ram inom vilken resultaten från denna testmetod används, kan kemikalier som ger cellviabilitet ovanför den definierade tröskelnivån anses vara icke-irriterande (dvs. > 50 %, ingen kategori).

KVALITETSDEMONSTRATION

13. Före rutinanvändning av någon av de tre validerade testmetoderna enligt denna testmetod bör laboratorierna påvisa sin tekniska kvalitet med användning av de tio referenskemikalier som förtecknas i tabell 1. För liknande metoder som utvecklas enligt denna testmetod eller för modifikationer av någon av de tre validerade metoderna bör de prestandastandardskrav som beskrivs i tillägg 2 till denna testmetod uppfyllas innan metoden används för lagstadgad testning.

14. Som en del av kvalitetsförfarandet rekommenderas att användarna efter mottagande av vävnaden verifierar dess barriäregenskaper enligt specifikationerna från RhE-modelltillverkaren. Detta är särskilt viktigt om vävnader transporteras över långa sträckor eller om transporten tar lång tid. När en metod har etablerats på ett framgångsrikt sätt och kvaliteten hos metodanvändningen har påvisats, behöver sådana verifikationer inte göras rutinmässigt. När en metod används rutinmässigt rekommenderas dock att bedömningen av barriäregenskaperna görs med jämna mellanrum.

Tabell 1

Referenskemikalier ([1])

Kemikalie	CAS-nummer	*In vivo* -gradering ([2])	Fysikaliskt tillstånd	Kategori enligt FN:s GHS eller CLP-förordningen
naftalenättiksyra	86-87-3	0	Fast ämne	Ingen kat.
isopropanol	67-63-0	0,3	Vätska	Ingen kat.

▼M3

Kemikalie	CAS-nummer	*In vivo* -gradering ([2])	Fysikaliskt tillstånd	Kategori enligt FN:s GHS eller CLP-förordningen
metylstearat	112-61-8	1	Fast ämne	Ingen kat.
heptylbutyrat	5870-93-9	1,7	Vätska	Ingen kat. (*Valfri kat. 3*) ([3]) ([4])
hexylsalicylat	6259-76-3	2	Vätska	Ingen kat. (*Valfri kat. 3*) ([3]) ([4])
cyklamenaldehyd	103-95-7	2,3	Vätska	Kat. 2
1-bromhexan	111-25-1	2,7	Vätska	Kat. 2
kaliumhydroxid (5 % vattenlösning)	1310-58-3	3	Vätska	Kat. 2
1-metyl-3-fenyl-1-piperazin	5271-27-2	3,3	Fast ämne	Kat. 2
heptanal	111-71-7	3,4	Vätska	Kat. 2

([1]) Dessa referenskemikalier är en underuppsättning av de referenskemikalier som användes i valideringsstudien.
([2]) *In vivo*-gradering enligt B.4 och OECD:s testriktlinje 404 (4).
([3]) I denna testmetod betraktas FN:s valfria GHS-kategori 3 (svagt irriterande ämnen) (1) som ”ingen kategori”.
([4]) FN:s valfria GHS-kategori 3 är inte tillämplig enligt CLP-förordningen.

FÖRFARANDE

15. Nedan följer en beskrivning av komponenterna och förfarandena för en RhE-metod för bedömning av hudirritation. En RhE-modell bör rekonstrueras, och den kan beredas i laboratoriet eller anskaffas på kommersiell väg. Det finns operativa standardförfaranden för EpiSkin™, EpiDerm™ SIT (EPI-200) och SkinEthic™ RhE att tillgå (26) (27) (28). Testningen ska genomföras enligt nedan angivna beskrivning.

RhE-testmetod, komponenter

Allmänna betingelser

16. Icke-transformerade humana keratinocyter ska användas för rekonstruktion av epitelvävnaden. Flera lager av viabla epitelceller (basala lager, taggcellslager och granulära lager) ska finnas under ett funktionellt hornlager. Hornlagret ska bestå av flera skikt och innehålla den väsentliga lipidprofilen för att ge en funktionell barriär som är tillräckligt robust för att stå emot snabb penetrering av cytotoxiska markörer (t.ex. natriumdodekylsulfat eller Triton X-100). Barriärfunktionen bör påvisas och kan bedömas antingen genom bestämning av den koncentration vid vilken markören minskar vävnadernas viabilitet med 50 % (IC_{50}) efter en fast exponeringstid eller genom att bestämma den exponeringstid som krävs för att minska cellviabiliteten med 50 % (ET_{50}) vid applicering av en viss fastställd koncentration av markören. RhE-modellens inneslutningsegenskaper ska förhindra att material kan passera runt hornlagret till den viabla vävnaden, vilket kan leda till en bristande modellering av hudexponeringen. RhE-modellen får inte vara förorenad med bakterier, virus, mykoplasma eller svamp.

▼M3

Funktionella betingelser

Viabilitet

17. För bestämning av viabiliteten används MTT-test (25). Användare av RhE-modellen bör se till att varje sats uppfyller de definierade kriterierna för negativ kontroll. Extraktionsmedlets optiska densitet (OD) bör vara tillräcklig låg, dvs. under 0,1. Godkända värden (inom en övre och en undre gräns) för den negativa kontrollens OD-värden (i betingelserna för testmetoden för hudirritation) fastställs av RhE-modellens utvecklare/leverantör, och godkända värden för de tre validerade metoderna anges i tabell 2. Det bör finnas dokumenterat att de vävnader som behandlas med den negativa kontrollen är stabila i odlingar (ger motsvarande resultat vid viabilitetsmätning) under testets hela exponeringsperiod.

Tabell 2

Godkända OD-värden för den negativa kontrollen

	Nedre gräns för godkännande	Övre gräns för godkännande
EpiSkin™ (SM)	≥ 0,6	≤ 1,5
EpiDerm™ SIT (EPI-200)	≥ 1,0	≤ 2,5
SkinEthic™ RHE	≥ 1,2	≤ 2,5

Barriärfunktion

18. Hornlagret och dess lipida sammansättning ska vara tillräcklig för att stå emot snabb penetrering av cytotoxiska markörkemikalier, t.ex. SDS eller Triton X-100, enligt uppskattningar genom IC_{50} eller ET_{50} (tabell 3).

Morfologi

19. Histologisk undersökning av RhE-modellen bör göras för att påvisa att strukturen motsvarar human hud (inklusive flerskiktat hornlager).

Reproducerbarhet

20. Resultaten av testning med positiv kontrollkemikalie och negativ kontroll bör påvisa reproducerbarhet över tiden.

Kvalitetskontroll

21. Utvecklaren/leverantören av RhE-modellen bör säkerställa och påvisa att varje sats RhE-modell som används uppfyller de fastställda produktkriterierna, där kriterierna för *viabilitet* (punkt 17), *barriärfunktion* (punkt 18) och *morfologi* (punkt 19) är de viktigaste. Dessa data bör ges till metodanvändarna så att de kan införliva informationen i testrapporten. Godkända värden (inom en övre och en undre gräns) för IC_{50} eller ET_{50} ska fastställas av utvecklaren/leverantören av RhE-modellen (eller en forskare om en intern modell används). Endast resultat som har producerats med kvalificerade vävnader kan godkännas för tillförlitlig beräkning av irritationsklassificering. Som exempel visas godkända värden för de tre validerade metoderna i tabell 3.

▼M3

Tabell 3

Exempel på kriterier för kvalitetskontroll för leverans av en sats

	Nedre gräns för godkännande	Övre gräns för godkännande
EpiSkin™ (SM) (18 timmars behandling med SDS) (26)	IC_{50} = 1,0 mg/ml	IC_{50} = 3,0 mg/ml
EpiDerm™ SIT (EPI-200) (1 % Triton X-100) (27)	ET_{50} = 4,8 timmar	ET_{50} = 8,7 timmar
SkinEthic™ RHE (1 % Triton X-100) (28)	ET_{50} = 4,0 timmar	ET_{50} = 9,0 timmar

Applicering av test- och kontrollkemikalier

22. Minst tre vävnadsbitar ska användas per testkemikalie och för kontrollerna i varje omgång. För vätskor och fasta ämnen appliceras en tillräcklig mängd av testkemikalien så att hudens yta täcks med ett jämnt lager så att en infinit dos undviks. Dosen ska vara minst 25 µl/cm^2 eller 25 mg/cm^2. För fasta ämnen fuktas hudens yta med avjoniserat eller destillerat vatten före appliceringen för att förbättra kontakten mellan testkemikalien och hudens yta. När det är möjligt ska fasta ämnen testas i form av ett fint pulver. Vid slutet av exponeringsperioden tvättas testämnet omsorgsfullt bort från hudens yta med buffrad vattenlösning eller 0,9-procentig NaCl. Beroende på vilken av de tre validerade RhE-metoderna som används varierar exponeringsperioden mellan 15 och 60 minuter och inkubationstemperaturen mellan 20 och 37 °C. Dessa exponeringsperioder och temperaturer optimeras för varje RhE-metod och beror på metodernas olika karaktär. Närmare beskrivning finns i de operativa standardförfarandena för metoderna (26) (27) (28).

23. Negativa kontroller (NC) och positiva kontroller (PC) ska användas parallellt vid varje testomgång för att visa att viabiliteten (med NC), barriärfunktionen och den resulterande känsligheten (med PC) hos vävnaderna ligger inom fastställda godkända historiska värden. För den positiva kontrollen föreslås 5-procentig vattenlösning av natriumdodekylsulfat. För den negativa kontrollen föreslås vatten eller fosfatbuffrad saltlösning.

Mätning av cellernas viabilitet

24. Den viktigaste faktorn i testningsförfarandet är att viabilitetsmätningarna inte utförs omedelbart efter exponeringen för testkemikalien, utan först efter att de sköljda vävnaderna har haft en tillräckligt lång inkubationstid i färskt medium efter behandlingen. Under denna period kan vävnaderna antingen återhämta sig från svagt irriterande effekter eller utveckla tydliga cytotoxiska effekter. Vid testoptimeringsfasen (11) (12) (13) (14) (15) påvisades att en inkubationstid på 42 timmar efter behandlingen är optimal.

25. MTT-metoden är en validerad kvantitativ metod som ska användas i denna testmetod för att mäta cellviabiliteten. Den kan användas på en tredimensionell vävnadsmodell. Vävnadsprovet placeras i en MTT-lösning av lämplig koncentration (t.ex. 0,3–1 mg/ml) i 3 timmar. Den kondenserade blå formazanprodukten extraheras sedan från vävnaden med ett lösningsmedel (t.ex. isopropanol, sur isopropanol) och koncentrationen av formazan mäts genom bestämning av OD vid 570 nm med ett filterbandpass på högst ± 30 nm.

▼M3

26. Testkemikaliens optiska egenskaper eller kemiska verkan på MTT kan störa bestämningen, vilket leder till en felaktig uppskattning av viabiliteten (testkemikalien kan förhindra eller vända färgutvecklingen, men kan även vara orsaken till den). Detta kan ske när en specifik testkemikalie inte avlägsnas fullständigt från vävnaden genom sköljning eller när den penetrerar överhuden. Om testkemikalien reagerar direkt på MTT (dvs. MTT-reduktion sker), är naturfärgad eller färgas under behandlingen av vävnaden, bör ytterligare kontroller göras så att man kan upptäcka och korrigera för testkemikaliens störande inverkan på tekniken för mätning av viabiliteten. Detaljerad beskrivning hur direkt MTT-reduktion och störningar av färgämnen kan korrigeras finns i de operativa standardförfarandena för de tre validerade metoderna (26) (27) (28).

Kriterier för godkännande

27. För varje metod där giltiga RhE-modellsatser används (se punkt 21) ska de vävnader som behandlats med negativ kontroll visa ett OD-värde som avspeglar kvaliteten på vävnader som har följt alla transport- och mottagningsförfaranden och alla protokollprocesser. Kontrollernas OD-värden bör inte ligga under de historiskt fastställda gränserna. Likaså bör vävnader som behandlats med den positiva kontrollkemikalien (5-procentig vattenlösning av natriumdodekylsulfat) avspegla deras förmåga att ge respons på en irritationsframkallade kemikalie i testmetodens betingelser (26) (27) (28). Lämpliga mått för variationerna mellan vävnadsbitarna bör fastställas (om t.ex. standardavvikelser används bör de ligga inom det ensidiga toleransintervall på 95 % som beräknats enligt historiska data, och för den validerade referensmetoden bör standardavvikelsen ligga under 18 %).

Tolkning av resultaten och förutsägbarhetsmodell

28. De OD-värden som erhålls för varje testkemikalie kan användas för att beräkna procentuell viabilitet jämfört med den negativa kontrollen, som fastställs till 100 %. Det procentuella viabilitetsgränsvärdet skiljer irriterande testkemikalier från icke-klassificerade testkemikalier, och det eller de statistiska förfarande(n) som används för att utvärdera resultaten och identifiera irriterande ämnen ska vara klart definierade och dokumenterade och ska vara bevisat lämpliga. Gränsvärdena för förutsägelse av irritation anges nedan.

— Testkemikalien anses vara irriterande för huden enligt kategori 2 i FN:s GHS eller CLP-förordningen om vävnadsviabiliteten efter exponering och efterföljande inkubation är mindre än eller lika med (≤) 50 %.

— Beroende på den rättsliga ram inom vilken resultaten från denna testmetod används, kan testkemikalien anses vara icke-irriterande för huden enligt ”ingen kategori” enligt FN:s GHS eller CLP-förordningen om vävnadsviabiliteten efter exponeringen och efterföljande inkubation är mer än (>) 50 %.

DATA OCH RAPPORTERING

Data

29. För varje omgång ska data från enskilda vävnadsbitar (t.ex. OD-värden och data om beräknad procentuell cellviabilitet för varje testkemikalie, inklusive klassificering) rapporteras i tabellform, i tillämpliga fall även data från upprepade försök. Dessutom ska medelvärden ± standardavvikelser för varje omgång rapporteras. Observerade interaktioner med MTT-reagenser och färgade testkemikalier ska rapporteras för varje testad kemikalie.

▼M3

Testrapport

30. Testrapporten ska innehålla följande information:

Test- och kontrollkemikalier:

— Kemikaliens namn – CAS-namn och -nummer, EG-namn och -nummer, om kända.

— Kemikaliens renhet och sammansättning (i procent per vikt).

— Fysikaliska/kemiska egenskaper som är relevanta för utförandet av undersökningen (t.ex. fysiskt tillstånd, stabilitet och flyktighet, pH-värde och vattenlöslighet, om kända).

— Behandling av test- och kontrollämnen före testning, om detta är tillämpligt (t.ex. uppvärmning, finfördelning).

— Lagringsförhållanden.

Motivering för den RhE-modell och det protokoll som använts.

Testbetingelser:

— Cellsystem.

— Fullständig stödjande information för den specifika RhE-modell som använts, inklusive modellens prestanda. Informationen ska omfatta men inte vara begränsad till följande:

  i) Viabilitet.

  ii) Barriärfunktion.

  iii) Morfologi.

  iv) Reproducerbarhet och förutsägbarhet.

  v) Kvalitetskontroller av modellen.

— Detaljerade uppgifter om försöksförfarandet.

— Använda testdoser, exponeringens varaktighet och inkubationstid efter behandlingen.

— Beskrivning av eventuella modifieringar av försöksförfarandet.

— Hänvisning till historiska uppgifter om modellen. Dessa ska omfatta men inte vara begränsade till följande:

  i) Uppgifter om huruvida kvalitetskontrolldata är godtagbara med avseende på historiska uppgifter om respektive använd sats.

  ii) Uppgifter om huruvida de positiva och negativa kontrollvärdena är godtagbara med avseende på positiva och negativa medelvärden och värdeområden.

— Beskrivning av använda utvärderingskriterier, inklusive motivering för valet av förutsägbarhetsmodellens gränsvärde(n).

— Hänvisningar till historiska kontrolldata.

▼M3

Resultat:

— Data i tabellform för enskilda testkemikalier för varje omgång och varje vävnadsmätning.

— Uppgifter om kontroller som använts för direkt MTT-reduktion och/eller färgade testkemikalier.

— Beskrivning av övriga observerade effekter.

Diskussion om resultaten.

Slutsatser.

HÄNVISNINGAR

(1) UN (2009), *United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS*), Third revised edition, UN New York and Geneva. Finns på: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev03/03files_e.html

(2) EC-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 (ESAC30), 9 April 2009. Finns på: http://ecvam.jrc.ec.europa.eu

(3) Europaparlamentets och rådets förordning (EG) nr 1272/2008 av den 16 december 2008 om klassificering, märkning och förpackning av ämnen och blandningar, ändring och upphävande av direktiven 67/548/EEG och 1999/45/EG samt ändring av förordning (EG) nr 1907/2006 (EUT L 353, 31.12.2008, s. 1).

(4) OECD (2004), Acute Dermal Irritation/Corrosion, OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 404, OECD, Paris. Finns på: http://www.oecd.org/env/testguidelines

(5) OECD (2004), *In Vitro* Skin Corrosion: Transcutaneous Electrical Resistance (TER), OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 430, OECD, Paris. Finns på: http://www.oecd.org/env/testguidelines

(6) OECD (2004), *In Vitro* Skin Corrosion: Human Skin Model Test, OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 431, OECD, Paris. Finns på: http://www.oecd.org/env/testguidelines

(7) OECD (2006), *In Vitro* Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion, OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 435, OECD, Paris. Finns på: http://www.oecd.org/env/testguidelines

(8) EC-ECVAM (2009), Performance Standards for *in vitro* skin irritation test methods based on Reconstructed human Epidermis (RhE)? Finns på: http://ecvam.jrc.ec.europa.eu

(9) 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. Finns på: http://www.oecd.org/env/testguidelines

(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. och 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. och 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.

▼M3

(12) Kandárová, H., Liebsch, M., Genschow, E., Gerner, I., Traue, D., Slawik, B. och 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. och 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. och 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. och 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., mailto: 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., mailto: Gamer, A., Remmele, M., Curren, R., Raabe, H., Cockshott, A., Gerner, I. och 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. Finns på: http://ecvam.jrc.ec.europa.eu

(18) Eskes, C., Cole, T., Hoffmann, S., Worth, A., Cockshott, A., Gerner, I. och 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. och 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, AATEX, 14, 351–358.

(20) EC-ECVAM (2007), Statement on the validity of *in vitro* tests for skin irritation, issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC26), 27 April 2007. Finns på: http://ecvam.jrc.ec.europa.eu

(21) EC-ECVAM (2007), Performance Standards for applying human skin models to *in vitro* skin irritation testing. Finns på: http://ecvam.jrc.ec.europa.eu

(22) EC-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. Finns på: http://ecvam.jrc.ec.europa.eu

(23) OECD (2010), Explanatory background document to the OECD draft Test Guideline on *in vitro* skin irritation testing. OECD Series on Testing and Assessment, No. 137, OECD, Paris. Finns på: http://www.oecd.org/document/24/0,3746,en_2649_34377_47858904_1_1_1_1,00.html

(24) Welss, T., Basketter, D.A. och 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.

▼**M3**

(25) Mosmann, T. (1983), Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods* 65, 55–63.

(26) EpiSkin™ SOP, Version 1.8 (February 2009), ECVAM Skin Irritation Validation Study: Validation of the EpiSkin™ test method 15 min – 42 hours for the prediction of acute skin irritation of chemicals. Finns på: http://ecvam.jrc.ec.europa.eu

(27) EpiDerm™ SOP, Version 7.0 (Revised March 2009), Protocol for: *In vitro* EpiDerm™ skin irritation test (EPI-200-SIT), For use with MatTek Corporation's reconstructed human epidermal model EpiDerm (EPI-200). Finns på: http://ecvam.jrc.ec.europa.eu

(28) SkinEthic™ RHE SOP, Version 2.0 (February 2009), SkinEthic skin irritation test-42bis test method for the prediction of acute skin irritation of chemicals: 42 minutes application + 42 hours post-incubation. Finns på: http://ecvam.jrc.ec.europa.eu

(29) Harvell, J.D., Lamminstausta, K. och Maibach, H.I. (1995), *Irritant contact dermatitis, In: Practical Contact Dermatitis*, sidorna 7–18, (Ed. Guin J. D.). Mc Graw-Hill, New York.

(30) Kommissionens direktiv 2001/59/EG av den 6 augusti 2001 om anpassning till tekniska framsteg för tjugoåttonde gången av rådets direktiv 67/548/EEG om tillnärmning av lagar och andra författningar om klassificering, förpackning och märkning av farliga ämnen (EUT L 225, 21.8.2001, s. 1).

(31) Basketter, D.A., York, M., McFadden, J.P. och Robinson, M.K. (2004), Determination of skin irritation potential in the human 4-h patch test. *Contact Dermatitis* 51, 1–4.

(32) Jirova, D., Liebsch, M., Basketter, D., Spiller, E., Kejlova, K., Bendova, H., Marriott, M. och Kandarova, H. (2007), Comparison of human skin irritation and photo-irritation patch test data with cellular *in vitro* assays and animal*in vivo* data, ALTEX, 14, 359–365.

(33) Jírová, D., Basketter, D., Liebsch, M., Bendová, H., Kejlová, K., Marriott, M. och Kandárová, H. (2010), Comparison of human skin irritation patch test data with *in vitro* skin irritation assays and animal data, *Contact Dermatitis*, 62, 109–116.

▼M3

Tillägg 1

Definitioner

Exakthet: Mått på hur väl testmetodresultaten och de godtagna referensvärdena överensstämmer med varandra. Exakthet är ett mått på testmetodens prestanda och en relevansaspekt. Detta begrepp används ofta omväxlande med ”konkordans” för att beskriva andelen korrekta resultat med en testmetod (9).

Cellviabilitet: En parameter för att mäta den totala aktiviteten hos en cellpopulation, t.ex. förmågan hos cellulära mitokondriella dehydrogenaser att reducera det vitala färgämnet MTT (3–(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazoliumbromid, tiazolylblått). Denna aktivitet korrelerar, beroende på den slutpunkt som uppmäts och den testutformning som används, med det totala antalet levande celler och/eller cellernas vitalitet.

Konkordans: Ett mått på testmetodens prestanda för sådana testmetoder som ger kategoriska resultat, och en aspekt av relevans. Termen används omväxlande med exakthet och definieras som andelen av alla testade kemikalier som klassificeras korrekt som positiva eller negativa (9).

ET_{50}: Uppskattas genom bestämning av den exponeringstid som krävs för att minska cellviabiliteten med 50 % vid applicering av markörkemikalien vid en specificerad, fast koncentration; se även IC_{50}.

CLP-förordningen (Europaparlamentets och rådets förordning (EG) nr 1272/2008 av den 16 december 2008 om klassificering, märkning och förpackning av ämnen och blandningar): Genom denna förordning genomförs i Europeiska unionen (EU) FN:s GHS-system för klassificering och märkning av kemikalier (ämnen och blandningar) (3).

GHS (det globalt harmoniserade systemet för klassificering och märkning av kemikalier – Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals): Ett system för att klassificera ämnen och blandningar enligt standardiserade typer och nivåer av fysiska risker, hälsorisker och miljörisker och informera om resultaten genom t.ex. piktogram, signalord, faroangivelser, skyddsangivelser och säkerhetsdatablad i syfte att informera om ämnenas skadliga effekter för att skydda personer (inklusive arbetsgivare, arbetstagare, transportörer, konsumenter och personal inom räddningstjänsten) och miljön (1).

IC_{50}: Kan uppskattas genom bestämning av den koncentration vid vilken en markörkemikalie minskar vävnadernas viabilitet med 50 % (IC_{50}) efter en fast exponeringstid; se även ET_{50}.

Infinit dos: Den mängd applicerad testkemikalie som överstiger den mängd som krävs för att helt täcka hudens yta med ett jämnt lager.

Me too-test: Ett vardagligt uttryck för en testmetod som strukturellt och funktionellt liknar en validerad och godtagen referenstestmetod. En sådan testmetod kan vara en kandidat för jämförande validering. Kallas även ”liknande testmetod” (9).

Prestandastandarder (PS): Standarder som baseras på en validerad testmetod och som utgör grunden för utvärdering av jämförbarheten för en föreslagen testmetod som är mekaniskt och funktionellt likartad. Dessa standarder omfattar i) testmetodens grundläggande komponenter, ii) en minimiförteckning med referenskemikalier som valts ut från de kemikalier som använts för att påvisa att den validerade metoden fungerar tillfredsställande och iii) de jämförbara nivåer av exakthet och tillförlitlighet, på grundval av vad som erhållits för den validerade testmetoden, som man bör kunna påvisa för den föreslagna testmetoden när den utvärderas med användning av minimiförteckningen med referenskemikalier (9).

▼M3

Referenskemikalier: Kemikalier som valts för användning i valideringsprocessen och för vilka responsen i *in vitro*- eller *in vivo*-referenstestsystem eller på de berörda arterna är känd. Kemikalierna bör vara representativa för de kemikalieklasser som testmetoden är avsedd för och bör representera hela skalan av respons som kan förväntas för de kemikalier som testas med metoden, från stark till svag till negativ. Det kan krävas olika uppsättningar referenskemikalier för valideringsprocessens olika skeden och för olika testmetoder och testanvändningar (9).

Relevans: Beskrivning av förhållandet mellan testet och den berörda effekten och huruvida detta förhållande är meningsfullt och användbart för ett visst ändamål. Relevansen är ett mått på hur väl man genom testet korrekt kan mäta och förutse den biologiska effekt det gäller. Relevans omfattar också överväganden om en testmetods exakthet (konkordans) (9).

Tillförlitlighet: Ett mått på i vilken utsträckning en testmetod kan reproduceras inom och mellan laboratorier över tiden när metoden utförs med samma protokoll. Den bedöms genom att man beräknar reproducerbarheten inom och mellan laboratorier (9).

Ersättningstest: Ett test som är utformat att ersätta ett test som används rutinmässigt och som är godkänt för faroidentifiering och/eller riskbedömning och som har konstaterats ge motsvarande eller bättre skydd av människors eller djurs hälsa eller miljön, enligt det som är tillämpligt, jämfört med det godkända testet, för alla tänkbara testningssituationer och kemikalier (9).

Känslighet: Den andel av alla positiva/aktiva testkemikalier som klassificeras korrekt i testet. Begreppet är ett mått på exaktheten hos sådana testmetoder som ger kategoriska resultat och är en viktig faktor vid bedömningen av en testmetods relevans (9).

Hudirritation: När en reversibel skada uppstår på huden i upp till fyra timmar efter applicering av en testkemikalie. Hudirritation är en lokal icke-immunogenisk reaktion som uppstår kort efter stimulans (29). Den mest utmärkande egenskapen är den reversibla processen som omfattar inflammatoriska reaktioner och de flesta av de kliniskt karakteristiska tecknen på irritation (hudrodnad, ödem, klåda och smärta) som hör samman med en inflammatorisk process.

Specificitet: Den andel av alla negativa/inaktiva testkemikalier som klassificeras korrekt i testet. Begreppet är ett mått på exaktheten hos sådana testmetoder som ger kategoriska resultat och är en viktig faktor vid bedömningen av en testmetods relevans (9).

Stegvis testningsstrategi: Testning där testmetoder används i serie så att de testmetoder som väljs på varje efterföljande nivå bestäms på grundval av föregående testningsnivå (9).

Testkemikalie (kallas också testämne): Alla ämnen eller blandningar som testas med denna testmetod.

▼M3

Tillägg 2

Prestandastandarder för bedömning av föreslagna liknande eller modifierade *in vitro*-metoder med rekonstruerad human hud (RhE) för att testa hudirritation

INLEDNING

1. Syftet med prestandastandarder är att tillhandahålla en grund för att fastställa att nya testmetoder, både äganderättsligt skyddade (dvs. metoder med upphovsrätt, varumärke, registrering) och allmänt tillgängliga metoder är tillräckligt exakta och tillförlitliga för specifika testningsändamål. Dessa prestandastandarder, som grundar sig på validerade och godtagna testmetoder, kan användas för att utvärdera tillförlitligheten och exaktheten hos andra analoga metoder (vardagligt även kallade me too-test) som grundar sig på liknande vetenskapliga principer och som mäter eller förutser samma biologiska eller toxikologiska effekt (9).

2. Innan man antar modifierade metoder (dvs. föreslagna potentiella förbättringar av en godkänd metod) krävs en utvärdering för att fastställa de föreslagna ändringarnas inverkan på testets prestanda och i vilken utsträckning förändringarna påverkar den information som finns att tillgå för de andra komponenterna i valideringsprocessen. Beroende på de föreslagna ändringarnas antal och karaktär, genererade data och stödjande dokumentation för ändringarna, bör de antingen vara föremål för samma valideringsprocess som gäller för nya testmetoder eller, där det är lämpligt, för en begränsad bedömning av tillförlitlighet och relevans med användning av etablerade prestandastandarder (9).

3. Liknande (me too-metoder) eller modifierade metoder av någon av de tre validerade metoderna (EpiSkin™ [validerad referensmetod], EpiDerm™ SIT [EPI-200] och SkinEthic™ RHE) som föreslås för användning inom denna testmetod bör utvärderas för tillförlitlighet och exaktheten när man använder kemikalier som representerar hela skalan av Draizes irritationspoäng. Vid utvärderingen med användning av de 20 rekommenderade referenskemikalierna enligt prestandastandarden (tabell 1) bör de föreslagna liknande eller modifierade metodernas värden för tillförlitlighet och exakthet vara jämförbara med eller bättre än de värden som fås med den validerade referensmetoden (tabell 2) (2) (16). De värden för tillförlitlighet och exakthet som bör nås anges i punkterna 8–12 i detta tillägg. Kemikalier i kategorin ”inte klassificerad” (”ingen kategori” enligt FN:s GHS eller CLP-förordningen) och kategorin ”klassificerad” (kategori 2 enligt FN:s GHS eller CLP-förordningen) (1) som representerar olika kemiska klasser ingår, så att den föreslagna metodens tillförlitlighet och exakthet (känslighet, specificitet och totala exakthet) kan jämföras med motsvarande värden för den validerade referensmetoden. Metodens tillförlitlighet, såväl som metodens förmåga att korrekt identifiera irriterande kemikalier i kategori 2 enligt FN:s GHS eller CLP-förordningen och, beroende på den rättsliga ram som gäller för de uppgifter som tas fram, även metodens förmåga att korrekt identifiera ”ingen kategori”-kemikalier enligt FN:s GHS eller CLP-förordningen, bör bestämmas innan metoden används för testning av nya kemikalier.

4. Dessa prestandastandarder baserar sig på EC-ECVAM:s prestandastandarder (8) som uppdaterats enligt FN:s GHS eller CLP-förordningens system för klassificering och märkning (1) (3). De ursprungliga prestandastandarderna fastställdes efter att valideringsstudien hade slutförts (21) och baserade sig på EU-klassificeringssystemet enligt kommissionens direktiv 2001/59/EG av den 6 augusti 2001 om anpassning till tekniska framsteg för tjugoåttonde gången av rådets direktiv 67/548/EEG om tillnärmning av lagar och andra författningar om klassificering, förpackning och märkning av farliga ämnen ([1]). Till följd av att FN:s GHS-system för klassificering och märkning

([1]) EGT L 225, 21.8.2001, s. 1.

▼M3

antogs i EU (CLP-förordningen) (3), vilket gjordes mellan slutförandet av valideringsstudien och slutförandet av denna testmetod (8), har prestandastandarderna uppdaterats. Uppdateringen gäller främst ändringar av i) uppsättningen referenskemikalier för prestandastandarderna och ii) de värden som fastställts för tillförlitlighet och exakthet (2) (23).

PRESTANDASTANDARDER FÖR IN VITRO-TESTMETODER MED RhE FÖR HUDIRRITATION

5. Prestandastandarderna består av följande tre element (9):

I. Testmetodens grundläggande komponenter

II. En minimiförteckning med referenskemikalier.

III. Definierade värden för tillförlitlighet och exakthet.

I. **Testmetodens grundläggande komponenter**

6. Dessa består av de grundläggande strukturella, funktionella och förfarandemässiga delarna i en validerad metod som bör ingå i protokollet för en föreslagen mekaniskt och funktionellt liknande eller modifierad metod. Dessa komponenter omfattar metodens unika egenskaper, kritiska förfarandemässiga detaljer och åtgärder för kvalitetskontroll. Att följa testmetodens grundläggande komponenter hjälper till att säkerställa att liknande eller modifierade metoder baserar sig på samma koncept som den motsvarande validerade referensmetoden (9). Testmetodens grundläggande komponenter beskrivs i detalj i punkterna 16–21 i testmetoden och testningen bör utföras enligt följande:

— Allmänna villkor (punkt 16).

— Funktionella villkor, som omfattar

  — viabilitet (punkt 17),

  — barriärfunktion (punkt 18),

  — morfologi (punkt 19),

  — reproducerbarhet (punkt 20), och

  — kvalitetskontroll (punkt 21).

II. **Minimiförteckning över referenskemikalier**

7. Referenskemikalier används för att bestämma tillförlitligheten och exaktheten hos en föreslagen liknande eller modifierad metod som har påvisats vara strukturellt och funktionellt tillräckligt motsvarande den validerade referensmetoden eller som representerar en mindre modifiering av en av de tre validerade metoderna, är jämförbar med eller är bättre än den validerade referensmetoden (2) (8) (16) (23). De 20 rekommenderade referenskemikalierna som förtecknas i tabell 1 omfattar kemikalier som representerar olika kemiska klasser (dvs. kemiska kategorier på grundval av funktionella grupper) och är representativa för hela skalan av Draizes irritationspoäng (från icke-irriterande till kraftigt irriterande). Kemikalierna i denna förteckning består av tio kemikalier i kategori 2 enligt FN:s GHS eller CLP-förordningen och tio icke-kategoriserade kemikalier, av vilka tre är frivilliga kemikalier i kategori 3 enligt FN:s GHS. Enligt denna testmetod anses den valfria kategorin 3 som ”ingen kategori”. Kemikalierna som förtecknas i tabell 1 är valda från de kemikalier som använts i optimeringsfasen som följde på förvalidering och i valideringsstudien för den validerade referensmetoden, med avseende på kemisk funktionalitet och fysikaliskt tillstånd (14) (18). Dessa referenskemikalier representerar det minsta antal kemikalier som bör användas för att utvärdera exaktheten och tillförlitligheten för föreslagna liknande eller modifierade metoder, men bör inte användas när nya

▼M3

metoder tas fram. I situationer där en kemikalie enligt förteckningen inte finns att tillgå, kan man använda andra kemikalier för vilka det finns adekvata *in vivo*-referensdata, primärt från de kemikalier som använts i optimeringsfasen som följt på förvalideringen eller valideringsstudien för den validerade referensmetoden. Om man vill kan ytterligare kemikalier från andra kemiska klasser för vilka det finns adekvata *in vivo*-referensdata läggas till minimiförteckningen över referenskemikalier för ytterligare utvärdering av den föreslagna testmetodens exakthet.

Tabell 1

Minimiförteckning över referenskemikalier för bestämning av exakthet och tillförlitlighet för liknande eller modifierade RhE-metoder för hudirritation [1]

Kemikalie	CAS-nummer	Fysikaliskt tillstånd	*In vivo*-gradering	Validerad referens-metod *in vitro*-kat.	FN:s GHS eller EU:s CLP *in vivo*-kat.
1-brom-4-klorbutan	6940-78-9	Vätska	0	Kat. 2	Ingen kat.
dietylftalat	84-66-2	Vätska	0	Ingen kat.	Ingen kat.
naftalenättiksyra	86-87-3	Fast ämne	0	Ingen kat.	Ingen kat.
allylfenoxiacetat	7493-74-5	Vätska	0,3	Ingen kat.	Ingen kat.
isopropanol	67-63-0	Vätska	0,3	Ingen kat.	Ingen kat.
4-metyltiobensaldehyd	3446-89-7	Vätska	1	Kat. 2	Ingen kat.
metylstearat	112-61-8	Fast ämne	1	Ingen kat.	Ingen kat.
heptylbutyrat	5870-93-9	Vätska	1,7	Ingen kat.	Ingen kat.
hexylsalicylat	6259-76-3	Vätska	2	Ingen kat.	Ingen kat.
kanelaldehyd	104-55-2	Vätska	2	Kat. 2	Ingen kat. (*Valfri kat. 3*) [3]
1-dekanol [2]	*112-30-1*	*Vätska*	*2,3*	*Kat. 2*	*Kat. 2*
cyklamenaldehyd	103-95-7	Vätska	2,3	Kat. 2	Kat. 2
1-bromhexan	111-25-1	Vätska	2,7	Kat. 2	Kat. 2
2-klormetyl-3,5-dimetyl-4-metoxipyridin HCl	86604-75-3	Fast ämne	2,7	Kat. 2	Kat. 2
di-n-propyldisulfid [2]	*629-19-6*	*Vätska*	*3*	*Ingen kat.*	*Kat. 2*
kaliumhydroxid (5 % vattenlösning)	1310-58-3	Vätska	3	Kat. 2	Kat. 2
bensentiol, 5-(1,1-dimetyletyl)-2-metyl	7340-90-1	Vätska	3,3	Kat. 2	Kat. 2
1-metyl-3-fenyl-1-piperazin	5271-27-2	Fast ämne	3,3	Kat. 2	Kat. 2

▼M3

Kemikalie	CAS-nummer	Fysikaliskt tillstånd	*In vivo*-gradering	Validerad referensmetod *in vitro*-kat.	FN:s GHS eller EU:s CLP *in vivo*-kat.
heptanal	111-71-7	Vätska	3,4	Kat. 2	Kat. 2
tetrakloretylen	127-18-4	Vätska	4	Kat. 2	Kat. 2

([1]) Urvalet kemikalier baserar sig på följande kriterier: i) kemikalierna finns kommersiellt tillgängliga, ii) de är representativa för hela skalan av Draizes irritationspoäng (från icke-irriterande till kraftigt irriterande), iii) de har en väl definierad kemisk struktur, iv) de är representativa för den kemiska funktionalitet som används i valideringsprocessen och v) de är inte förknippade med någon extremt toxisk profil (t.ex. karcinogena eller toxiska för reproduktionssystemet) och de är inte förknippade med orimliga bortskaffningskostnader.

([2]) Kemikalier som är irriterande på kanin men för vilka det finns tillförlitliga belägg om att de inte är irriterande för människor (31) (32) (33).

([3]) Enligt FN:s GHS, inte enligt CLP-förordningen.

III. **Definierade värden för tillförlitlighet och exakthet.**

8. För att etablera tillförlitligheten och relevansen för föreslagna liknande eller modifierade metoder som kan överföras mellan laboratorier bör alla 20 referenskemikalierna i tabell 1 testas i minst tre laboratorier. Om den föreslagna metoden endast ska användas i ett enskilt laboratorium krävs inte testning i flera laboratorier för valideringen. Det är ändå av största vikt att sådana valideringsstudier bedöms fristående av internationellt erkända valideringsorgan, i enlighet med internationella riktlinjer (9). Alla 20 referenskemikalierna ska i varje laboratorium testas vid tre oberoende omgångar som genomförs med olika vävnadsuppsättningar och med tillräckliga tidsintervaller mellan varandra. Varje omgång ska minst bestå av tre parallellt testade vävnadsbitar för varje berörd testkemikalie, negativ kontroll och positiv kontroll.

9. Vid beräkningen av värden för tillförlitlighet och exakthet för den föreslagna metoden bör alla de fyra nedan angivna kriterierna beaktas, för att garantera att tillförlitlighet och relevans bestäms på ett förhandsdefinierat och enhetligt sätt:

   1. Endast data från testomgångar som ingår i fullständiga sekvenser får användas för beräkning av metodens variabilitet inom och mellan laboratorier och förutsägande kapacitet (exakthet).

   2. Den slutliga klassificeringen för varje referenskemikalie i varje deltagande laboratorium ska göras genom att använda viabilitetsmedelvärdet för de olika omgångarna som ingår i en fullständig sekvens.

   3. Endast data som erhållits för kemikalier för vilka det har gjorts fullständiga sekvenser av testomgångar i alla deltagande laboratorier får användas för beräkning av metodens variabilitet mellan laboratorier.

   4. Värdena för exakthet ska beräknas på grundval av de enskilda laboratoriernas förutsägelser som erhållits för de 20 referenskemikalierna vid de olika deltagande laboratorierna.

   I detta sammanhang avses med **sekvens av omgångar** tre oberoende testomgångar vid ett laboratorium för en testkemikalie. En **fullständig sekvens av omgångar** är en sekvens för en testkemikalie vid ett laboratorium där alla tre testomgångarna är giltiga. Det betyder att en enskild ogiltig omgång gör hela sekvensen på tre omgångar ogiltig.

Reproducerbarhet inom laboratorier

10. En utvärdering av reproducerbarheten inom ett laboratorium bör ge en konkordans för klassificeringar (kategori 2 och ”ingen kategori” enligt FN:s GHS eller CLP-förordningen) som erhålls i olika och oberoende testomgångar med de 20 referenskemikalierna vid ett enda laboratorium. Konkordansen ska vara lika med eller högre (≥) än 90 %.

▼M3

Reproducerbarhet mellan laboratorier

11. En utvärdering av reproducerbarheten mellan laboratorier är inte nödvändig om den föreslagna metoden endast ska användas vid ett enskilt laboratorium. För metoder som ska överföras mellan laboratorier ska den konkordans för klassificeringarna (kategori 2 och ”ingen kategori” enligt FN:s GHS eller CLP-förordningen) som erhålls i olika och oberoende testomgångar med de 20 referenskemikalierna mellan helst minst tre laboratorier vara lika med eller högre (≥) än 80 %.

Förutsägande kapacitet (exakthet)

12. Exaktheten (känslighet, specificitet och total exakthet) för den föreslagna liknande eller modifierade metoden bör vara jämförbar med eller bättre än exaktheten för den validerade referensmetoden, med beaktande av tilläggsinformation rörande relevans hos arten i fråga (tabell 2). Känsligheten ska vara lika med eller högre (≥) än 80 % (2) (8) (23). Det finns också en ytterligare särskild begränsning som gäller för känsligheten hos den föreslagna *in vitro*-metoden såtillvida att endast två *in vivo*-kemikalier i kategori 2, *1-dekanol* och *di-n-propyldisulfid,* får klassificeras felaktigt som ”ingen kategori” av fler än ett deltagande laboratorium. Specificiteten ska vara lika med eller högre (≥) än 70 % (2) (8) (23). Det finns inga ytterligare begränsningar rörande specificiteten för den föreslagna *in vitro*-metoden, dvs. de deltagande laboratorierna får felklassificera *in vivo*-kemikalier som ”ingen kategori” så länge som testmetodens slutliga specificitet ligger inom det godtagbara området. Den totala exaktheten ska vara lika med eller högre (≥) än 75 % (2) (8) (23). Även om den validerade referensmetodens känslighet beräknad för de 20 referenskemikalierna som förtecknas i tabell 1 är lika med 90 %, är det definierade minimivärdet för känsligheten som krävs för alla liknande eller modifierade metoder som övervägs satt till 80 %, eftersom både *1-dekanol* (en gränskemikalie) och *di-n-propyldisulfid* (falsk negativ i den validerade referensmetoden) är kända för att vara icke-irriterande för människa (31) (32) (33), även om de identifieras som irriterande ämnen i kanintest. Eftersom RhE-modellerna är baserade på celler av mänskligt ursprung kan de förutsäga att dessa kemikalier inte är irriterande (”ingen kategori” enligt FN:s GHS eller CLP-förordningen).

Tabell 2

Förutsägande värden för känslighet, specificitet och total exakthet som krävs för att en liknande eller modifierad metod ska anses vara giltig

Känslighet	Specificitet	Total exakthet
≥ 80 %	≥ 70 %	≥ 75 %

Kriterier för godkännande av ett försök

13. Det är möjligt att ett eller flera test som hör samman med en eller flera testkemikalier inte uppfyller kriterierna för godkänt för test- och kontrollkemikalierna eller inte kan godkännas av andra orsaker. För att komplettera data som saknas är det tillåtet att för varje testkemikalie göra högst två tilläggstest (omtestning). Det betyder alltså att då även positiv kontroll och negativ kontroll måste testas parallellt vid omtestning får man genomföra högst två extra omgångar för varje testkemikalie.

14. Det är möjligt, även efter omtestning, att det minimiantal på tre giltiga omgångar som krävs för varje testad kemikalie inte erhålls för varje referenskemikalie i varje deltagande laboratorium, och då är den resulterande datamatrisen ofullständig. I sådana fall bör alla följande tre kriterier uppfyllas för att datauppsättningarna ska anses vara godtagbara:

1. Det bör finnas minst en fullständig sekvens av omgångar för alla 20 referenskemikalierna.

▼**M3**

2. I minst tre deltagande laboratorier måste minst 85 % av sekvenserna vara fullständiga (för 20 kemikalier, dvs. 3 ogiltiga sekvenser tillåts i ett enskilt laboratorium).

3. Minst 90 % av alla möjliga sekvenser från minst tre laboratorier måste vara fullständiga (för 20 kemikalier som testats i tre laboratorier, dvs. totalt tillåts 6 ogiltiga sekvenser).

▼M7

B.47 TESTMETODEN BCOP (BOVINE CORNEAL OPACITY AND PERMEABILITY) FÖR IDENTIFIERING AV I) KEMIKALIER SOM ORSAKAR ALLVARLIG ÖGONSKADA OCH II) KEMIKALIER FÖR VILKA DET INTE KRÄVS KLASSIFICERING FÖR ÖGONIRRITATION ELLER ALLVARLIG ÖGONSKADA

INLEDNING

Denna testmetod motsvarar OECD:s testriktlinje (TG) 437 (2013). BCOP-testmetoden utvärderades 2006 och 2010 (1)(2) av amerikanska ICCVAM (*Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods*) tillsammans med Europeiska centret för bestämning av alternativa metoder (ECVAM) och det japanska centret för validering av alternativa metoder (JaCVAM). I den första utvärderingen undersökte man om BCOP-testmetoden var användbar för att identifiera kemikalier (ämnen och blandningar) som framkallar allvarliga ögonskador (1). I den andra utvärderingen undersökte man om BCOP-testmetoden var användbar för att identifiera kemikalier (ämnen och blandningar) som inte är klassificerade för ögonirritation eller allvarliga ögonskador (2). BCOP-valideringsdatabasen innehöll totalt 113 ämnen och 100 blandningar (2) (3). Av dessa utvärderingar och granskningarna av dessa drog man slutsatsen att testmetoden korrekt kan identifiera kemikalier (både ämnen och blandningar) som inducerar allvarlig ögonskada (kategori 1) samt kemikalier som inte kräver klassificering för ögonirritation eller allvarlig ögonskada enligt FN:s globala harmoniserade system för klassificering och märkning av kemikalier (GHS) (4) och förordning (EG) nr 1272/2008 om klassificering, märkning och förpackning av ämnen och blandningar (CLP-förordningen) ([1]). Metoden ansågs därför vara vetenskapligt giltig för båda ändamålen. Med allvarlig ögonskada avses vävnadsskada i ögat eller allvarlig synnedsättning som uppstår efter applicering av ett en testkemikalie på ögats främre yta och som inte är fullt reversibel inom 21 dagar från appliceringen. Testkemikalier som inducerar allvarliga ögonskador klassificeras som GHS-kategori 1 enligt FN:s system. Kemikalier som inte klassificerats för ögonirritation eller allvarliga ögonskador definieras som kemikalier som inte uppfyller kraven för att klassificeras som GHS-kategori 1 eller 2 (2A eller 2B), dvs. klassificeringen GHS Ingen klassificering. Denna testmetod beskriver rekommenderad användning av och begränsningar hos BCOP-testmetoden baserat på utvärderingarna. De största skillnaderna mellan den ursprungliga versionen från 2009 och den uppdaterade versionen från 2013 av OECD-testriktlinje avser, men är inte begränsade till, användning av BCOP-testmetoden för att identifiera kemikalier som inte kräver klassificering enligt GHS (punkterna 2 och 7), förtydliganden av tillämpningen av BCOP-testmetoden för testning av alkoholer, ketoner och fasta ämnen (punkterna 6 och 7) och av ämnen och blandningar (punkt 8), förtydliganden av hur ytaktiva ämnen och blandningar som innehåller ytaktiva ämnen bör testas (punkt 28), uppdateringar och förtydliganden av positiva kontroller (punkterna 39 och 40), uppdatering av beslutskriterierna för BCOP-testmetoden (punkt 47), en uppdatering av acceptanskriterier för undersökningar (punkt 48), en uppdatering av de uppgifter som ska ingå i provningsrapporten (punkt 49), en uppdatering av definitionerna i bilaga 1, en ny bilaga 2 om BCOP-testmetodens prediktionsförmåga enligt olika klassificeringssystem, en uppdatering av förteckningen över kemikalier för kvalitetstest samt en uppdatering av tillägg 4 om BCOP-hornhinnehållaren (punkt 1) och opacitetsmätaren (punkterna 2 och 3).

([1]) Europaparlamentets och rådets förordning (EG) nr 1272/2008 av den 16 december 2008 om klassificering, märkning och förpackning av ämnen och blandningar, ändring och upphävande av direktiven 67/548/EEG och 1999/45/EG samt ändring av förordning (EG) nr 1907/2006 (EUT L 353, 31.12.2008, s. 1).

▼M7

Det är allmänt vedertaget att inget ögonirritationstest in vitro inom överskådlig framtid kommer att kunna ersätta Draizes ögontext in vivo för att förutsäga alla typer av ögonirritation för olika kemiska klasser. Strategiska kombinationer av flera alternativa testmetoder inom ramen för en (differentierad) teststrategi kan dock ersätta Draizes ögontest (5). Uppifrån och ned-strategin (5) är utformad för att användas när en kemikalie förväntas vara mycket irriterande baserat på befintlig information, medan botten-upp-strategin (5) å sin sida är utformad för att användas när en kemikalie inte förväntas orsaka tillräcklig ögonirritation för att kräva en klassificering baserat på befintlig information. BCOP-testmetoden är en testmetod in vitro som kan användas under vissa omständigheter och med särskilda begränsningar för klassificering och märkning av kemikalier som är farliga för ögonen. BCOP-testmetoden anses i sig inte vara en giltig ersättning för test på kaninögon in vivo, men rekommenderas som ett första steg i en teststrategi såsom den uppifrån och ned-strategi som föreslagits av Scott m.fl. (5) För att identifiera kemikalier som inducerar allvarlig ögonskada, dvs. kemikalier som klassificeras som GHS-kategori 1, utan ytterligare testning (4). BCOP-testmetoden rekommenderas också för att identifiera kemikalier som inte kräver klassificering för ögonirritation eller allvarlig ögonskada enligt definitionen i GHS (GHS Ingen klassificering) (4) inom ramen för en teststrategi som botten-upp-strategin (5). Kemikalier som inte förutsägs orsaka allvarlig ögonskada eller inte klassificeras för ögonirritation/allvarlig ögonskada enligt BCOP-testmetoden kräver dock ytterligare testning (in vitro och/eller in vivo) för att fastställa en definitiv klassificering.

Syftet med denna testmetod är att beskriva de förfaranden som används för att utvärdera om kemikalien kan vara skadlig för ögonen, mätt som kemikaliens förmåga att framkalla opacitet och öka permeabiliteten i en isolerad hornhinna från nötkreatur. De toxiska effekterna på hornhinnan mäts med hjälp av i) minskad ljustransmission (opacitet) och ii) ökad passage av natriumfluorescein (permeabilitet). Bedömningen av hornhinnans opacitet och permeabilitet efter exponeringen för testkemikalien kombineras till ett IVIS-värde (In Vitro Irritancy Score), som används för att klassificera testkemikaliens förmåga att framkalla irritation.

Definitioner av begreppen finns i tillägg 1.

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN OCH BEGRÄNSNINGAR

Testmetoden baserar sig på BCOP-testmetodsprotokollet från amerikanska ICCVAM (6) (7), som i sin tur ursprungligen utvecklades på grundval av information från IIVS:s protokoll (*Institute for In Vitro Sciences*) och INVITTOX-protokollet 124 (8), som representerar det protokoll som användes för den förvalideringsstudie av BCOP-test som genomfördes 1997–1998 och sponsrades av Europeiska gemenskapen. Båda dessa protokoll baserades på den BCOP-testmetod som först rapporterades av Gautheron m.fl. (9).

BCOP-testmetoden kan användas för att identifiera kemikalier som inducerar allvarlig ögonskada enligt GHS, dvs. kemikalier som klassificeras som GHS-kategori 4 (4). När BCOP-testmetoden används för detta syfte har den en övergripande noggrannhet på 79 % (150/191), ett falskt positivt värde på 25 % (32/126) och ett falskt negativt värde på 14 % (9/65) jämfört med in vivo-testning på kaninögon enligt klassificeringssystemet GHS (3) (se tillägg 2, tabell 1). När testkemikalier inom en viss kemikalie (dvs. alkoholer, ketoner) eller fysiska

▼M7

(dvs. fasta) klasser undantas från databasen har BCOP-testmetoden en övergripande noggrannhet på 85 % (111/131), ett falskt positivt värde på 20 % (16/81) och ett falskt negativt värde på 8 % (4/50) enligt klassificeringssystemet GHS (3). BCOP-testmetodens begränsningar när den används för att identifiera kemikalier som inducerar allvarlig ögonskada (GHS-kategori 1) baserar sig på höga falska positiva värden för alkoholer och ketoner och höga falska negativa värden för fasta ämnen som observerats i valideringsdatabasen (1)(2)(3). Alla alkoholer och ketoner överskattas dock inte av BCOP-testmetoden och vissa klassificeras korrekt som GHS-kategori 1, vilket innebär att dessa två organiska funktionella grupper inte anses gå utöver testmetodens tillämpningsområde. Det är upp till användaren av testmetoden att avgöra om en eventuell överprediktion av en alkohol eller en keton kan godtas eller om ytterligare testning krävs enligt en weight-of-the-evidence-metod. När det gäller falska negativa värden för fasta ämnen bör det noteras att fasta ämnen kan leda till varierande och extrema exponeringsförhållanden i Draizes ögonirritationstest in vivo, vilket i sin tur kan leda till irrelevanta förutsägelser om ämnets verkliga irritationspotential (10). När det gäller identifiering av kemikalier som inducerar allvarlig ögonskada (GHS-kategori 1) bör det också noteras att inget av de falska negativa värden som identifieras i ICCVAM-validationsdatabasen (2)(3) ledde till IVIS ≤ 3, vilket är det kriterium som används för att identifiera en testkemikalie i GHS-kategorin Ingen klassificering. Falska negativa värden är inte kritiska i detta sammanhang, eftersom alla testkemikalier som ger ett värde på 3 < IVIS ≤ 55 därefter testas med andra lämpligt validerade in vitro-test och som ett sista alternativ på kaniner, beroende på kraven i tillämpliga bestämmelser, med tillämpning av en strategi med stegvis testning enligt principen om sammanvägd bedömning Med tanke på att vissa fasta kemikalier korrekt klassificeras som GHS-kategori 1 enligt BCOP-testmetoden anses inte heller detta fysiska tillstånd gå utöver testmetodens tillämpningsområde. Forskare kan överväga att använda denna testmetod för alla kemikalier. I ett sådant fall bör IVIS > 55 godtas som en indikation på en respons som inducerar allvarlig ögonskada och kemikalien bör klassificeras som GHS-kategori 1 utan ytterligare testning. Som redan nämnts bör positiva resultat från test med alkoholer eller ketoner dock tolkas försiktigt på grund av risken för överprediktion.

BCOP-testmetoden kan också användas för att identifiera kemikalier som inte kräver klassificering för ögonirritation eller allvarlig ögonskada enligt GHS-klassificeringssystemet (4). När BCOP-testmetoden används för detta syfte har den en övergripande noggrannhet på 69 % (135/196), ett falskt positivt värde på 69 % (61/89) och ett falskt negativt värde på 0 % (0/107) jämfört med in vivo-testning på kaninögon enligt klassificeringssystemet GHS (3) (se tillägg 2, tabell 2). Det falska positiva värde som erhålls (in vivo, kemikalier som klassificeras som GHS Ingen klassificering och som ger värdet IVIS > 3, se punkt 47) är högt, men inte kritiskt i detta sammanhang, eftersom alla testkemikalier som ger ett värde på 3 < IVIS ≤ 55 testas vidare med andra lämpligt validerade in vitro-test, eller som ett sista alternativ på kaniner beroende på lagstadgade krav, med användning av en stegvis teststrategi enligt en weight-of-evidence-metod. BCOP-testmetoden visar inga specifika brister när det gäller testning av alkoholer, ketoner och fasta ämnen när syftet är att identifiera kemikalier som inte kräver klassificering för ögonirritation eller allvarlig ögonskada (GHS Ingen klassificering) (3). Forskarna bör överväga att använda denna testmetod för alla typer av kemikalier. Ett negativt resultat (IVIS ≤ 3) bör godtas som en indikation på att ingen klassificering krävs (GHS Ingen klassificering). Eftersom endast 31 % av de kemikalier som inte kräver klassificering för ögonirritation eller allvarlig ögonskada kan identifieras med hjälp av BCOP-testmetoden, bör denna testmetod inte vara förstahandsvalet för en botten-upp-strategi (5), om andra validerade och godkända in vitro-metoder med liknande hög sensitivitet men högre specificitet finns tillgängliga.

▼M7

BCOP-valideringsdatabasen innehöll totalt 113 ämnen och 100 blandningar (2) (3). BCOP-testmetoden anses därför vara tillämplig på testning av både ämnen och blandningar.

BCOP-testmetoden rekommenderas inte för identifiering av testkemikalier som bör klassificeras som irriterande för ögonen (GHS-kategori 2 eller 2A) eller testkemikalier som bör klassificeras som måttligt irriterande för ögonen (GHS-kategori 2b), eftersom det finns ett stort antal kemikalier i GHS-kategori 1 som är underklassificerade som GHS-kategori 2, 2A eller 2B medan andra kemikalier i GHS-kategorin Ingen klassificering är överklassificerade som GHS-kategori 2, 2A eller 2B (2) (3). Därför kan det krävas ytterligare testning med en annan passande metod.

Alla förfaranden som omfattar ögon och hornhinnor från nötkreatur bör respektera testningslaboratoriets tillämpliga regler och förfaranden för hantering av material som kommer från djur, omfattande men inte begränsat till vävnader och vävnadsvätskor. Likaså rekommenderas allmänna försiktighetsåtgärder för laboratorier (11).

BCOP-testmetoden beaktar inte skador på ögats bindhinna (konjunktiva) eller iris, men däremot skador på hornhinnan, som är den viktigaste in vivo-klassificeringen med avseende på GHS-klassificeringen. Reversibiliteten hos hornhinneskador kan i sig inte utvärderas med BCOP-test. På grundval av studier av kaninögon har det föreslagits att en bedömning av det initiala djupet för hornhinneskada kan användas för att identifiera vissa typer av irreversibla effekter (12). Det krävs dock ytterligare vetenskaplig kunskap för att man ska kunna förstå hur irreversibla effekter som inte är kopplade till en initialt allvarlig skada kan uppstå. Slutligen gäller att BCOP inte ger möjlighet att bedöma potentialen för systemisk toxicitet associerad med okulär exponering.

Testmetoden kommer att uppdateras regelbundet allteftersom ny information och data övervägs. Histopatologi kan t.ex. eventuellt vara användbart om en mer fullständig karakterisiering av skador på hornhinnan krävs. Såsom anges i OECD:s vägledningsdokument nr 160 (13) uppmuntras användarna att bevara hornhinnor och bereda histopatologiska prover som kan användas för att utveckla en databas och beslutskriterier för att ytterligare förbättra metodens noggrannhet.

Laboratorier som tar denna testmetod i bruk för första gången bör använda de kvalifikationskemikalier som förtecknas i bilaga 3. Ett laboratorium kan använda dessa kemikalier för att påvisa sin tekniska kompetens att genomföra BCOP-testmetoden innan det lämnar in BCOP-testdata avsedda för lagstadgad faroklassificering.

TESTMETODENS PRINCIP

BCOP-testmetoden är en organotypisk modell enligt vilken hornhinnan från nötkreatur under kort tid bibehåller normal fysiologisk och biokemisk funktion in vitro. Testmetoden innebär att skador framkallade av testkemikalien bedöms med kvantitativa mätningar av ändringar i korneal opacitet och permeabilitet med opacitetsmätare respektive spektrofotometer för synligt ljus. Med hjälp av resultaten från de två mätningarna beräknas ett IVIS-värde som används för att bestämma en in vitro-klassificering av farokategori för prognos av testkemikaliens potential att framkalla ögonirritation in vivo (se beslutskriterierna i punkt 48).

För BCOP-testmetoden används isolerade hornhinnor från ögon som tillvaratagits från nyligen slaktade nötkreatur. Den korneala opaciteten mäts kvantitativt som ljustransmissionen genom hornhinnan. Permeabiliteten mäts kvantitativt som mängden natriumfluorescein som passerar genom hornhinnans hela djup enligt

▼M7

mätning i mediet i hornhinnehållarens bakre kammare. Kemikalierna appliceras på hornhinnans epitelyta via den främre kammaren. I tillägg 4 finns en beskrivning och en schematisk bild av den hornhinnehållare som används vid BCOP-testmetoden. Hornhinnehållare finns att köpa på marknaden hos olika leverantörer eller kan konstrueras i laboratoriet.

Källa och ålder för ögon från nötkreatur, val av djurart

Nötkreatur som sänds till slakterier avlivas i regel för användning som livsmedel eller för andra kommersiella ändamål. Endast friska djur som anses vara lämpliga för användning i livsmedelskedjan får användas för tillvaratagande av hornhinnor som används vid BCOP-testmetoden. Eftersom nötkreaturens vikt kan variera stort beroende på ras, ålder och kön finns det ingen rekommenderad slaktvikt för de djur som används.

Hornhinnornas dimensioner kan variera beroende på djurens ålder. Hornhinnor med en horisontell diameter > 30,5 mm och en central hornhinnetjocklek (CCT) ≥ 1100 μm kommer i regel från nötkreatur som är äldre än åtta år, medan hornhinnor med en horisontell diameter < 28,5 mm och CCT < 900 μm i regel kommer från nötkreatur som är yngre än fem år (14). Därför används normalt inte ögon från nötkreatur som är äldre än 60 månader. Ögon från nötkreatur som är yngre än 12 månader används i regel inte eftersom ögonen fortfarande håller på att utvecklas och hornhinnans tjocklek och diameter är betydligt mindre än de värden som rapporteras för ögon från vuxna nötkreatur. Hornhinnor från unga djur (6–12 månader) får dock användas eftersom det medför vissa fördelar såsom bättre tillgänglighet, smalare åldersintervall och lägre risker för att de anställda exponeras för bovin spongiform encefalopati (15). Det vore värdefullt med ytterligare utvärdering av hur hornhinnans storlek eller tjocklek påverkar responsen från frätande och irriterande kemikalier, och därför uppmanas användarna att rapportera uppskattad ålder och/eller vikt för de djur vars hornhinna använts för undersökningen.

Tillvaratagande och transport av ögon till laboratoriet

Ögonen tas till vara av slakteriets personal. För att minimera mekaniska och andra typer av skador på ögonen bör dessa tas till vara så snart som möjligt efter slakten och kylas omedelbart efter tillvaratagande och under transport. För att hindra att ögonen exponeras för potentiellt irriterande kemikalier bör rengöringsmedel inte användas vid sköljning av djurets huvud vid slakteriet.

Ögonen bör hållas helt nedsänkta i kylda HBSS (Hanks Balanced Salt Solution) i ett kärl av lämplig storlek, och transporteras till laboratoriet på sådant sätt att skador och/eller bakterieförorening minimeras. Eftersom ögonen tas till vara under slaktningen utsätts de eventuellt för blod och andra biologiska material, inbegripet bakterier och andra mikroorganismer. Det är därför viktigt att minimera föroreningsrisken (t.ex. genom att hålla kärlet med ögonen på krossad is under insamling och transport samt lägga till antibiotika i HBSS-förvaringslösningen, t.ex. 100 IE/ml penicillin eller 100 μg/ml streptomycin).

Tiden mellan tillvaratagande av ögonen och användningen av hornhinnorna i BCOP-testmetoden bör minimeras (normalt bör tillvaratagande och användning ske samma dag) och det måste påvisas att väntetiden inte stör analysresultaten. Dessa baserar sig på urvalskriterierna för ögonen såväl som på positiv och negativ kontrollrespons. Alla ögon som används för testning bör komma från samma grupp av ögon som har tillvaratagits en viss dag.

Urvalskriterier för ögon som används för BCOP-testmetoden

När ögonen har tagits emot vid laboratoriet ska de undersökas omsorgsfullt för skador såsom ökad opacitet, repor och nykärlsbildning. Endast hornhinnor från oskadade ögon får användas.

▼M7

De individuella hornhinnornas kvalitet utvärderas också i senare steg i testningen. Hornhinnor vars opacitet efter en inledande jämviktsperiod på en timme är högre än sju opacitetsenheter eller motsvarande för opacitetsmätaren och använda hornhinnehållare ska förkastas (*OBS:* opacitetsmätaren ska kalibreras med opacitetsstandarder för opacitetsenheter, se tillägg 4).

Varje behandlingsgrupp (testkemikalie, parallella negativa och positiva kontroller) ska bestå av minst tre ögon. För den negativa kontrollen enligt BCOP-testmetoden ska tre hornhinnor användas. Eftersom hornhinnorna skärs ut från globen som helhet och därefter monteras i hornhinnekamrarna, finns det en risk för att de individuella värdena för korneal opacitet och permeabilitet (inbegripet negativ kontroll) påverkas av artefakter från hanteringen. Vidare används opacitets- och permeabilitetsvärden från de negativa kontrollernas hornhinnor för att korrigera de opacitets- och permeabilitetsvärden från testade kemiskt behandlade och positivkontrollerade hornhinnor som används för IVIS-beräkningarna.

FÖRFARANDE

Förberedelse av ögonen

Defektfria hornhinnor skärs ut med en 2–3 mm omgivande kant av senhinna som är avsedd att underlätta efterföljande hantering. Var noga med att undvika skador på hornhinnans epitel och endotel. Hornhinnorna monteras en och en i särskilt utformade hornhinnehållare som har en bakre och en främre kammare som angränsar mot hornhinnans epitelsida respektive endotelsida. Båda kamrarna fylls med förvärmt EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium) i överskott (bakre kammaren först). Se till så att det inte bildas bubblor. Därefter hålls utrustningen vid 32 ± 1 °C i minst en timme så att jämvikt nås mellan mediet och hornhinnorna och normal metabolisk aktivitet uppstår i den mån det är möjligt (en hornhinna in vivo har en ungefärlig temperatur på 32 °C).

Efter jämviktsperioden tillsätts färskt förvärmt EMEM fritt från fenolrött till båda kamrarna och grundvärden för opacitet mäts på varje hornhinna. Efter jämviktsperioden tillsätts färskt förvärmt EMEM fritt från fenolrött till båda kamrarna och grundvärden för opacitet mäts på varje hornhinna. Alla hornhinnor som uppvisar en makroskopisk vävnadsskada (t.ex. repor, pigmentering, kärlnybildning) eller opacitet över 7 opacitetsenheter eller motsvarande för opacitetsmätaren och hornhinnehållarna ska förkastas. Opacitetsmedelvärdet beräknas för alla jämviktsbehandlade hornhinnor. Minst tre hornhinnor väljs ut som exemplar för negativa kontroller (eller lösningsmedelskontroller). Återstående hornhinnor delas upp i behandlingsgrupp och positiv kontrollgrupp.

Eftersom vatten har en högre värmekapacitet än luft, ger vatten stabilare temperaturförhållanden för inkubation. Därför rekommenderas vattenbad för att hålla hornhinnehållaren och dess innehåll vid 32 ± 1 °C. Luftinkubatorer kan dock också användas under förutsättning att temperaturen hålls stabil (t.ex. genom förvärmning av hållare och media).

Applicering av testkemikalien

Två olika behandlingsprotokoll används, ett för vätskor och ytaktiva ämnen (fasta eller flytande) och ett för fasta ämnen som inte är ytaktiva.

Vätskor testas i outspädd form. Halvfasta ämnen, krämer och vaxer testas normalt som vätskor. Rena ytaktiva ämnen testas vid en koncentration på 10 % vikt/volym i en 0,9 % natriumkloridlösning, destillerat vatten eller annat lösningsmedel som påvisbart inte har negativa effekter på testsystemet. Om andra utspädningskoncentrationer används bör detta motiveras. Blandningar som innehåller ytaktiva ämnen kan testas outspädda eller utspädda till en lämplig koncentration,

▼M7

beroende på det aktuella exponeringsscenariot in vivo. Lämplig motivering bör ges för den testade koncentrationen. Hornhinnorna exponeras för vätskor och ytaktiva ämnen under 10 minuter. Om avvikande exponeringstider används bör tillbörlig vetenskaplig motivering ges. Definitioner av ytaktiva ämnen och blandningar innehållande ytaktiva ämnen ges i tillägg 1.

Fasta ämnen som inte är ytaktiva testas normalt som lösningar eller suspensioner vid 20 % vikt/volym i en 0,9 % natriumkloridlösning, destillerat vatten eller annat lösningsmedel som påvisbart inte har negativa effekter på testsystemet. I vissa förhållanden och med angivande av tillbörlig vetenskaplig motivering kan fasta ämnen också testas i ren form med direkt applicering på hornhinnans yta med användning av metoden med öppen kammare (se punkt 32). Hornhinnorna exponeras för fasta ämnen under fyra timmar, och på samma sätt som med vätskor och ytaktiva ämnen måste avvikande exponeringstider motiveras med tillbörliga vetenskapliga grunder.

Olika behandlingsmetoder kan användas, beroende på testkemikaliens fysikaliska natur och kemiska egenskaper (t.ex. fasta ämnen, vätskor och viskösa respektive icke-viskösa vätskor). Den kritiska faktorn är att se till att testkemikalien täcker epitelytan tillräckligt och att det avlägsnas effektivt under sköljningsstegen. Metoden med sluten kammare används normalt vid testning av icke-viskösa till lätt viskösa kemikalier, medan metoden med öppen kammare normalt används för semiviskösa och viskösa kemikalier och rena fasta ämnen.

När sluten kammare används tillförs testkemikalien i den främre kammaren genom doseringshålen på kammarens övre yta i tillräcklig mängd (750 µl) för att täcka hornhinnans epitelsida och därefter hålls hålen förslutna med pluggar under exponeringen. Det är viktigt att varje hornhinna exponeras för testkemikalien under avsedd tidslängd.

När öppen kammare används ska den främre kammarens fönsterlåsring och glasfönster avlägsnas före behandlingen. Kontroll- eller testkemikalien (750 µl eller tillräckligt för att täcka hornhinnan helt) tillförs direkt på hornhinnans epitelyta med hjälp av en mikropipett. Om testkemikalien är svår att pipettera kan den i stället appliceras med en s.k. positive displacement-pipett. Positive displacement-pipettens spets införs i sprutans doseringsspets så att ämnet kan tryckas in i positive displacement-spetsen. Samtidigt dras sprutkolven ut medan pipettens pistong dras uppåt. Om det uppstår bubblor i pipettspetsen ska testkemikalien avlägsnas (tryckas ut) och förfarandet upprepas till dess att spetsen fylls utan att det uppstår luftbubblor. Vid behov kan man använda en vanlig spruta (utan nål) eftersom den ger möjlighet att mäta en exakt volym av testkemikalien och underlättar appliceringen på hornhinnans epitelyta. Efter doseringen monteras glasfönstret tillbaka på den främre kammaren så att systemet återförsluts.

Inkubation efter exponering

Efter exponeringsperioden avlägsnas testkemikalien, eller den kemikalie som används för negativ eller positiv kontroll, från den främre kammaren och epitelytan tvättas minst tre gånger (eller till dess att ingen testkemikalie kan observeras visuellt på ytan) med EMEM (med fenolrött). Medium innehållande fenolrött används för sköljning eftersom färgändringen av fenolrött kan användas som indikator på effektiv sköljning av sura eller alkaliska testkemikalier. Hornhinnorna ska tvättas mer än tre gånger om färgförändringen av fenolrött kvarstår

▼M7

(gult eller purpurrött) eller om rester av testkemikalien kan observeras. När mediet är rent från testkemikalien görs en slutsköljning av hornhinnorna med EMEM (utan fenolrött). EMEM (utan fenolrött) används som slutsköljning för att säkerställa att allt fenolrött avlägsnas från den främre kammaren före opacitetsmätningen. Därefter fylls den främre kammaren på nytt med färskt EMEM utan fenolrött.

För vätskor och ytaktiva ämnen ska hornhinnorna efter sköljning inkuberas i ytterligare två timmar vid 32 ± 1 °C. Längre tider kan vara till fördel under vissa omständigheter och kan övervägas från fall till fall. Hornhinnor som exponerats för fasta ämnen sköljs grundligt efter den fyra timmar långa exponeringen och kräver ingen efterföljande inkubation.

Efter den inkubationsperiod som följer på exponeringen (vätskor och ytaktiva ämnen) eller efter slutet av den fyra timmar långa exponeringsperioden (icke-ytaktiva fasta ämnen) görs mätningar av opaciteten och permeabiliteten för varje hornhinna. Varje hornhinna granskas också visuellt och relevanta observationer noteras (t.ex. avflagning av vävnad, rester av testkemikalien, oenhetliga opacitetsmönster). Sådana observationer kan vara viktiga eftersom de också är kopplade till variationer av opacitetsmätarens avläsningar.

Kontrollkemikalier

Parallella negativa kontroller eller lösningsmedels-/vehikelkontroller och positiva kontroller ingår i varje försök.

Vid testning av ett vätskeformigt ämne vid 100 % ska BCOP-testmetoden inbegripa en parallell negativ kontroll (t.ex. 0,9 % natriumkloridlösning eller destillerat vatten) så att icke-specifika ändringar i testsystemet kan upptäckas och för att ge en bakgrundsnivå för testningens endpoint. På så sätt säkerställs också att testningsförhållandena inte i onödan framkallar irritation.

Vid testning av en utspädd vätska, ett ytaktivt ämne eller ett fast ämne ska BCOP-testmetoden omfatta en parallell kontrollgrupp med lösningsmedel/vehikel så att icke-specifika ändringar i testsystemet kan upptäckas och för att ge en bakgrundsnivå för testningens endpoint. Endast lösningsmedel/vehikel som påvisbart inte har negativa effekter på testsystemet får användas.

En kemikalie som är känd att inducera positiv respons inkluderas som en parallell positiv kontroll i varje försök för att kontrollera testsystemets integritet och se till att det tillämpas korrekt. För att säkerställa att den positiva kontrollresponsen kan bedömas över tiden bör den irritation som framkallas inte vara för stark.

Exempel på en positiv kontrollkemikalie för testning av flytande testkemikalier är 100 % etanol eller 100 % dimetylformamid. Exempel på en positiv kontrollkemikalie för testning av fasta ämnen är 20 % (vikt/volym) imidazol i 0,9 % natriumkloridlösning.

Referenskemikalier kan användas för utvärdering av förmågan att framkalla ögonirritation hos okända kemikalier tillhörande en specifik kemisk klass eller produktklass, eller för utvärdering av den relativa irritationspotentialen hos ett ögonirriterande ämne inom ett specifikt responsområde.

Mätning av endpoints

Opaciteten bestäms enligt ljustransmissionen genom hornhinnan. Hornhinnans opacitet mäts kvantitativt med hjälp av en opacitetsmätare som mäter opacitetsvärden på en kontinuerlig skala.

Permeabiliteten bestäms med hjälp av mängden natriumfluorescein som passerar hela hornhinnan (dvs. epitelet på hornhinnans yttre yta och genom hornhinnan till endotelet på hornhinnans inre yta). 1 ml natriumfluoresceinlösning (4 eller 5 mg/ml vid testning av vätskor och ytaktiva ämnen respektive icke-ytaktiva fasta ämnen) tillförs hornhinnehållarens främre kammare (den som angränsar mot hornhinnans epitelsida) medan den bakre kammaren (den som angränsar

▼M7

mot hornhinnans endotelsida) fylls med färskt EMEM. Därefter inkuberas hållaren i horisontellt läge i 90 ± 5 minuter vid 32 ± 1 °C. Mängden natriumfluorescein som kommer in i den bakre kammaren mäts kvantitativt med hjälp av UV/VIS-spektrofotometri. De spektrofotometriska mätningarna vid 490 nm noteras som optisk densitet (OD490) eller absorbansvärden som mäts på en kontinuerlig skala. Permeabilitetsvärdena för fluorescein bestäms genom OD490-värden med en spektrofotometer för synligt ljus och en standardvåglängd på 1 cm.

Alternativt kan man använda en 96-håls mikrotiterplatta förutsatt att i) det linjära området för avläsning av plattan när det gäller fluorescein OD490-värden kan fastställas och ii) korrekt volym fluoresceinprover används i mikrotiterplattan för att få OD490-värden som motsvarar standardväglängden 1 cm (för detta krävs eventuellt att brunnen är helt full, i regel 360 l).

DATA OCH RAPPORTERING

Utvärdering av data

När opacitetsvärdena och permeabilitetsmedelvärdena (OD490) har korrigerats för bakgrundsopacitet och den negativa kontrollens permeabilitetsvärden (OD490), ska varje behandlingsgrupps medelvärden för opacitet och permeabilitet (OD490) kombineras i en empiriskt härledd formel för beräkning av IVIS-värdet (In Vitro Irritancy Score) enligt följande:

IVIS = medelvärdet för opacitet + (15 × medelvärdet för permeabilitet OD490)

Sina m.fl. (16) har rapporterat att denna formel härleddes under försök som utfördes inom och mellan laboratorier. Data som genererades för en serie med 36 föreningar i en undersökning som omfattade flera laboratorier användes som indata i en multivariat analys för bestämning av vilken ekvation som ger den bästa anpassningen mellan in vivo- och in vitro-data. Analysen genomfördes av forskare på två separata företag och de resulterande ekvationerna var nästan identiska.

Opacitets- och permeabilitetsvärdena bör också utvärderas fristående för att fastställa huruvida en testkemikalie har en frätande eller kraftigt irriterande verkan endast genom en av de två endpoints (se beslutskriterierna).

Beslutskriterier

IVIS-brytpunktsvärden för att identifiera testkemikalier som framkallar allvarliga ögonskador (GHS-kategori 1) och testkemikalier som inte kräver klassificering för ögonirritation eller allvarliga ögonskador (GHS Ingen klassificering) ges nedan:

IVIS	GHS
≤ 3	Ingen klassificering
> 3, ≤ 55	Ingen förutsägelse kan göras
> 55	Kategori 1

Kriterier för godkännande av ett försök

Ett försök anses vara godkänt om den positiva kontrollen ger ett IVIS-värde som faller inom två standardavvikelser för det aktuella historiska medelvärdet, som måste uppdateras minst var tredje månad, eller varje gång ett godkänt test genomförs i laboratorier där försök genomförs oregelbundet (mindre än en gång per månad). Responsen från den negativa kontrollen eller lösningsmedels-/vehikelkontrollen bör ge opacitets- och permeabilitetsvärden som är lägre än de fastställda övre gränserna för bakgrundsvärden för opacitet och permeabilitet för nötkreatursHornhinnor behandlade med negativa kontrollämnen eller lösningsmedel/vehikler. En enda testomgång med minst tre hornhinnor bör vara tillräcklig

▼M7

för en testkemikalie förutsatt att den resulterande klassificeringen är otvetydig. Om den första testomgången ger resultat som ligger på gränsen bör en andra testomgång övervägas (men är inte alltid nödvändig). Om medelvärdet för IVIS-resultaten inte överensstämmer mellan de två första testomgångarna bör en tredje testomgång övervägas. I detta sammanhang anses resultat i den första testomgången vara gränsfall om förutsägelserna för de tre hornhinnorna inte överensstämde, om

— två av tre hornhinnor gav förutsägelser som inte överensstämde med medelvärdet för samtliga tre hornhinnor, ELLER

— om en av de tre hornhinnorna gav en förutsägelse som inte överensstämde med medelvärdet för samtliga tre hornhinnor OCH det icke-överensstämmande resultatet var > 10 IVIS enheter från brytpunkten 55.

— Om en upprepad testomgång bekräftar förutsägelsen från den första testomgången (baserat på IVIS-medelvärdet) kan ett slutligt beslut fattas utan ytterligare testning. Om resultaten från den upprepade testomgången ger en förutsägelse som inte överensstämmer med den första testomgången (baserat på IVIS-medelvärdet) bör en tredje och slutlig testomgång utföras för att lösa tvetydiga förutsägelser och klassificera testkemikalien. Undantag från kravet på ytterligare testning för klassificering och märkning kan göras om en testomgång ger en förutsägelse som överensstämmer med GHS-kategori 1.

Testrapport

Testrapporten ska innehålla följande uppgifter i den mån de är relevanta:

Test- och kontrollkemikalier:

— Kemisk beteckning såsom den strukturella beteckning som används i Chemical Abstracts Service (CAS) och eventuella andra kända beteckningar samt CAS-registreringsnummer om det är känt.

— Test-/kontrollkemikaliens renhet och sammansättning (viktprocent) i den mån uppgifterna finns att tillgå.

— Fysikalisk-kemiska egenskaper, t.ex. fysikaliskt tillstånd, flyktighet, pH, stabilitet, kemisk klass och vattenlöslighet, i den mån de är relevanta.

— Behandling av test-/kontrollämnen före testning, om detta är tillämpligt (t.ex. uppvärmning, finfördelning).

— Stabilitet, om den är känd.

Uppgifter om sponsor och testanläggning

— Namn och adress för sponsor, testanläggning och försöksledare.

Testmetodens betingelser

— Opacitetsmätare (t.ex. modell och specifikationer) samt instrumentinställningar.

— Kalibreringsinformation för utrustning som använts för mätning av opacitet och permeabilitet (t.ex. opacitetsmätare och spektrofotometer) för att säkerställa att mätningarna är linjära.

— Typ av hornhinnehållare (t.ex. modell och specifikationer).

▼M7

— Beskrivning av annan använd utrustning.

— Det förfarande som används för att säkerställa testmetodens integritet (dvs. noggrannhet och tillförlitlighet) över tiden (t.ex. periodisk testning med kvalifikationskemikalier).

Kriterier för godtagbart försök

— Godtagbara intervaller för parallella positiva och negativa kontroller på grundval av historiska data.

— Om tillämpligt, godtagbara intervaller för parallella referenskontroller på grundval av historiska data.

Insamling och förberedelse av ögon

— Angivelse av ögonkällan (den anläggning där ögonen togs till vara).

— Hornhinnans diameter som ett mått på djurets ålder och lämplighet för försöket.

— Förvarings- och transportförhållanden för ögonen (t.ex. datum och tidpunkt för tillvaratagande, tidsperiod före inledning av försöket, transportmedium och temperaturförhållanden, eventuella antibiotika som använts).

— Förberedelse och montering av de nötkreatursornhinnor som använts, inbegripet utlåtanden om deras kvalitet, temperatur för hornhinnehållare samt urvalskriterier för de hornhinnor som valts ut för testning.

TESTFÖRFARANDE

— Antal använda replikat.

— Uppgift om använda negativa och positiva kontroller (i förekommande fall även lösningsmedel och referenskontroller).

— Testkemikaliens koncentration(er), applicering, exponeringstid samt inkubationstid efter exponering.

— Beskrivning av utvärderings- och beslutskriterierna.

— Beskrivning av acceptanskriterierna för undersökningen.

— Beskrivning av eventuella modifieringar av försöksförfarandet.

— Beskrivning av beslutskriterierna.

Resultat

— Data i tabellform för enskilda testprover (t.ex. opacitet och OD490-värden och beräknade IVIS-värden för testkemikalien och de positiva och negativa kontrollerna samt referenskontroller om sådana ingått, inbegripet data från replikat och upprepade försök, beroende på vad som är lämpligt, och medelvärden inklusive standardavvikelse för varje försök).

— Beskrivning av övriga observerade effekter.

— Härledd GHS-klassificering in vitro, i förekommande fall.

Diskussion av resultaten

Slutsats

▼**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. Finns 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. Finns 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) FN (2011). United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), ST/SG/AC.10/30 Rev 4, New York och Genève: Förenta nationerna. Finns 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. och 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. Finns på http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm.

(7) ICCVAM (2010). ICCVAM Recommended BCOP Test Method Protocol. I: ICCVAM testmetod utvärderingsrapport – Aktuellt Validering status *in vitro* Testmetoder som föreslås för identifiering ögonskada farlighet av kemikalier och produkter. 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: 99–4494. 10-7553A. Finns på http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/MildMod-TMER.htm.

(8) JAGNVJAGTTOX (1999). Protocol 124: Bovine Corneal Opacity and Permeability Assay – SOP of Microbiological Associates Ltd. Ispra, Italien: Europeiska centret för bestämning av alternativa metoder (ECVAM).

(9) Gautheron, P., Dukic, M., Alix, D. och Sina, J.F. (1992). Bovjagne corneal OPACjagty och permEABjaglDety test: enn *jagn vjagtro* enssay av ocular jagrrDetenncy. *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. Available: [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. Antagen 25 oktober 2011. Paris Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling.

(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. och Bradley, R. (1997). BSE: A decade on – Part I. The Lancet 349: 636–641.

(16) Sjagna, JF., Genler, D.M., Sussmen, R.S., Genutheron, P.D., Senrgsvt, E.V., Leong, B., Shah, P.V., Curren, R.D., Och Mjagller, 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 denna bilaga, Akut ögonirritation/ögonkorrosion.

(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. Finns 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:s principer om god laboratoriesed (omarbetade 1997).

Finns på http://www.oecd.org/document/63/0,3343,en_2649_34381_2346175_1_1_1_1,00.html

▼M7

Tillägg 1

DEFINITIONER

Noggrannhet: mått på hur väl testmetodresultaten och de godtagna referensvärdena överensstämmer med varandra. Noggrannhet är ett mått på testmetodens prestanda och relevansaspekt. Detta begrepp används ofta omväxlande med ”konkordans” för att beskriva andelen korrekta resultat med en testmetod.

Referenskemikalie: en kemikalie som används som standard för jämförelse med en testkemikalie. En referenskemikalie bör ha följande egenskaper: i) eller flera enhetliga och tillförlitliga källor, ii) strukturell och funktionell likhet med den kemikalieklass som testas, iii) kända fysikalisk-kemiska egenskaper, iv) stödjande data om kända effekter och v) känd styrka inom det önskade responsområdet.

Botten-upp-strategi: stegvis metod som tillämpas på kemikalier som inte tros kräva klassificering för ögonirritation eller allvarlig ögonskada. Det första steget är att skilja kemikalier som inte behöver klassificeras (negativt utfall) från andra kemikalier (positivt utfall).

Kemikalie: ett ämne eller en blandning.

Hornhinna (kornea): den transparenta delen på ögonglobens framsida som täcker iris och pupillen och släpper igenom ljus in i ögat.

Korneal opacitet: mått för den grad av opacitet som hornhinnan har efter exponering för en testkemikalie. Ökad korneal opacitet tyder på skador på hornhinnan. Opaciteten kan utvärderas subjektivt (Draizes test på kaninögon) eller objektivt med ett instrument såsom en opacitetsmätare.

Korneal permeabilitet: kvantitativt mått på skada på hornhinnans epitel genom bestämning av den mängd natriumfluorescein som passerar genom hornhinnans alla cellager.

Ögonirritation: ändringar som uppstår i ögat efter applicering av en testkemikalie på ögats främre yta och som inte är fullt reversibla inom 21 dagar från appliceringen. Utbytbart mot ”Reversibla effekter på ögat” och ”GHS-kategori 2” (4).

Falskt negativt värde: den andel av alla positiva ämnen som av en testmetod felaktigt identifieras som negativ. Det är en indikator på testmetodens prestanda.

Falskt positivt värde: den andel av alla negativa (icke-aktiva) ämnen som av en testmetod felaktigt identifieras som positiva. Det är en indikator på testmetodens prestanda.

Fara: inneboende egenskap hos ett ämne eller en situation som har potential att orsaka skadliga effekter när en organism, ett system eller en (del-)population exponeras för ämnet.

In Vitro Irritancy Score (IVIS): en empiriskt härledd formel som används vid BCOP-testmetoden och där medelvärdet för opacitet och medelvärdet för permeabilitet för varje behandlingsgrupp kombineras till ett enda in vitro-värde. IVIS = medelvärdet för opacitet + (15 × medelvärdet för permeabilitet)

Irreversibla effekter på ögat: Se ”Allvarliga ögonskador”.

▼M7

Blandning: En blandning eller en lösning som består av två eller flera ämnen i vilka de inte reagerar (4)

Negativ kontroll: ett obehandlat replikat som innehåller alla komponenter i ett testsystem. Detta prov hanteras tillsammans med testkemikaliebehandlade prover och andra kontrollprover för att avgöra huruvida lösningsmedlet påverkar testsystemet.

Ej klassificerad: Kemikalier som inte är klassificerade som ögonirriterande (GHS-kategori 2, 2A eller 2B) eller för allvarlig ögonskada (GHS-kategori 1). Utbytbart mot ”GHS Ingen klassificering”.

Opacitetsmätare: ett instrument för mätning av korneal opacitet genom en kvantitativ utvärdering av ljustransmissionen genom hornhinnan. Det har i regel två kamrar med var sin ljuskälla och var sin fotocell. Ena kammaren används för den behandlade hornhinnan och den andra används för kalibrering och nollställning av instrumentet. Ljus från en halogenlampa sänds genom kontrollkammaren (en tom kammare utan fönster eller vätska) till en fotocell och jämförs med ljuset som sänds genom försökskammaren (i vilken hornhinnan finns) till en fotocell. Instrumentet mäter skillnaden mellan fotocellernas ljustransmission och visar ett numeriskt värde på en digital display.

Positiv kontroll: ett replikat som innehåller testsystemets alla komponenter och behandlas med ett ämne som veterligen inducerar positiv respons. För att säkerställa att den positiva kontrollresponsens variationer kan bedömas över tiden, bör den kraftiga irritation som framkallas inte vara för stark.

Reversibla effekter på ögat: se ”ögonirritation”.

Tillförlitlighet: mått på i vilken utsträckning en testmetod kan reproduceras inom och mellan laboratorier över tiden när den utförs med hjälp av samma protokoll. Tillförlitligheten bedöms genom att man beräknar reproducerbarheten inom och mellan laboratorier och repeterbarheten inom laboratorier.

Allvarliga ögonskador: vävnadsskada i ögat eller kraftig synnedsättning som uppstår efter applicering av en testkemikalie på ögats främre yta och som inte är fullt reversibel inom 21 dagar från appliceringen (2). Utbytbart mot ”Irreversibla effekter på ögat” och ”GHS kategori 1” (4).

Lösningsmedels-/vehikelkontroll: ett obehandlat prov som innehåller testsystemets alla komponenter, inbegripet lösningsmedlet eller vehikeln som behandlas tillsammans med testkemikaliebehandlade prover och andra kontrollprover i syfte att fastställa bakgrundsrespons för de prover som behandlas med testkemikalien upplöst i samma lösningsmedel eller vehikel. När detta prov testas med en parallell negativ kontroll visar provet också huruvida lösningsmedlet eller vehikeln påverkar testsystemet.

Ämne: kemiska grundämnen och deras föreningar i naturlig eller framställd form, inklusive eventuella tillsatser nödvändiga för att bevara produktens stabilitet och sådana föroreningar som härrör från framställningsprocessen, men exklusive eventuella lösningsmedel som kan avskiljas utan att det påverkar ämnets stabilitet eller ändrar dess sammansättning (4).

▼M7

Ytaktivt ämne: Ett ämne, såsom ett rengöringsmedel, som kan minska en vätskas ytspänning så att lödder bildas eller fasta ämnen penetrerar. Även kallat tensid eller vätmedel.

Blandning innehållande ytaktiva ämnen: inom ramen för denna testmetod, en blandning som innehåller ett eller flera ytaktiva ämnen med en slutlig koncentration på > 5 %.

Uppifrån och ned-strategi: stegvis metod som tillämpas på kemikalier som misstänks orsaka allvarlig ögonskada. Det första steget är att skilja kemikalier som inducerar allvarlig ögonskada (positivt utfall) från andra kemikalier (negativt utfall).

Testkemikalie: alla ämnen eller blandningar som testas med denna testmetod.

Stegvis testningsstrategi: en strategi för stegvis testning där all befintlig information om en testkemikalie granskas i en angiven ordning, med användning av förfarandet med sammanvägd bedömning (weight of evidence) för att avgöra om det finns tillräckligt med information till hands för att besluta om faroklassificering innan man går vidare till nästa steg. Om testkemikaliens förmåga att framkalla irritation kan fastställas på grundval av befintlig information behövs ingen ytterligare testning. Om testkemikaliens förmåga att framkalla irritation inte kan fastställas på grundval av befintlig information genomförs ett stegvis sekventiellt djurförsöksförfarande tills att det går att fastställa en otvetydig klassificering.

GHS (globalt harmoniserat system för klassificering och märkning av kemikalier: ett system för att klassificera ämnen och blandningar enligt standardiserade typer och nivåer av fysiska risker, hälsorisker och miljörisker och informera om resultaten genom t.ex. piktogram, signalord, faroangivelser, skyddsangivelser och säkerhetsdatablad i syfte att informera om ämnenas skadliga effekter för att skydda personer (inklusive arbetsgivare, arbetstagare, transportörer, konsumenter och personal inom räddningstjänsten) och miljön (4).

GHS-kategori 1: se ”allvarliga ögonskador”.

GHS-kategori 2: se ”ögonirritation”.

GHS Ingen klassificering: Kemikalier som inte uppfyller kraven för att klassificeras som GHS-kategori 1 eller 2 (2A eller 2B). Utbytbart mot ”Ej klassificerad”.

Validerad testmetod: en testmetod för vilken valideringsstudier har genomförts för att fastställa relevans (inbegripet noggrannhet) och tillförlitlighet för ett specifikt ändamål. Det är viktigt att notera att en validerad testmetod kanske inte är tillräckligt noggrann och tillförlitlig när det gäller ett visst föreslaget ändamål

Sammanvägd bedömning: (weight of evidence) ett förfarande där man bedömer styrkor och svagheter hos flera uppgifter för att nå fram till och motivera en slutsats rörande en testkemikalies faropotential.

▼M7

Tillägg 2

BCOP-TESTMETODENS FÖRUTSÄGANDE KAPACITET

Tabell 1

BCOP-testmetodens prediktionsförmåga att identifiera kemikalier som inducerar allvarliga ögonskador [GHS/EU CLP kat. 1 jämfört med Ingen kat. 1 (kat. 2 + Ingen kat.), US EPA kat. I jämfört med Ingen kat. I (kat. II + kat. III + kat. IV)]

Klassificerings system	Nr	Noggrannhet		Känslighet		Falskt negativ		Specificitet		Falskt positiv	
		%	Nr	%	Nr	%	Nr	%	Nr	%	Nr
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

Tabell 2

BCOP-testmetodens prediktionsförmåga att identifiera kemikalier som inte kräver klassificering som ögonirriterande eller för allvarlig ögonskada (”icke-irriterande ämnen”) [GHS EU CLP Ingen kat. mot Ingen kat. (kat. 1 + kat. 2), US EPA kat. IV mot Ingen kat. IV (kat. I + kat. II + kat. III)]

Klassificerings system	Nr	Noggrannhet		Känslighet		Falskt negativ		Specificitet		Falskt positiv	
		%	Nr	%	Nr	%	Nr	%	Nr	%	Nr
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

Tillägg 3

KVALIFIKATIONSÄMNEN FÖR BCOP-TESTMETODEN

Före rutinanvändning av en testmetod bör laboratoriet påvisa den tekniska kvaliteten genom att korrekt identifiera klassificeringen av kemikalier som är farliga för ögonen för de 13 kemikalier som rekommenderas i tabell 1. Dessa ämnen har valts ut för att representera responsskalan för ämnen som är farliga för ögonen enligt resultaten från in vivo-test på kaninögon (TG 405) (17) och GHS-kategorierna 1, 2A, 2B eller ingen klassificering (4). Till övriga kriterier hör att ämnena ska vara kommersiellt tillgängliga, att det finns tillgång till in vivo-referensdata av hög kvalitet och att det finns data av hög kvalitet från BCOP-testmetoden. Referensdata finns i Streamlined Summary Document (SSD) (3) och i ICCVAM Background Review Document för BCOP-testmetoden (2)(18).

Tabell 1

Rekommenderade ämnen för att påvisa teknisk kvalitet med BCOP-testmetoden

Kemikalie	CASRN	Kemisk klass (1)	Fysikalisk form	In vivo-klassificering (2)	BCOP-klassificering
Bensalkoniumklorid (5 %)	8001-54-5	Oniumförening	Vätskor	Kategori 1	Kategori 1
Klorhexidin	55-56-1	Amin, amidin	Fast ämne	Kategori 1	Kategori 1
Dibensoyl-L-tartarsyra	2743-38-6	Karboxylsyra, ester	Fast ämne	Kategori 1	Kategori 1
Imidazol	288-32-4	Heterocyklisk förening	Fast ämne	Kategori 1	Kategori 1
Triklorättiksyra (30 %)	76-03-9	Karboxylsyra	Vätskor	Kategori 1	Kategori 1
2,6-dimetylbensoylklorid	4659-45-4	Acylhalid	Vätskor	Kategori 2A	Ingen exakt/tillförlitlig förutsägelse kan göras
Etyl-2-metylacetoacetat	609-14-3	Keton, ester	Vätskor	Kategori 2B	Ingen exakt/tillförlitlig förutsägelse kan göras
Ammoniumnitrat	6484-52-2	Oorganiskt salt	Fast ämne	Kategori 2 (3)	Ingen exakt/tillförlitlig förutsägelse kan göras
EDTA, di-kaliumsalt	25102-12-9	Amin, karboxylsyra (salt)	Fast ämne	Ej klassificerat	Ej klassificerat
Tween 20	9005-64-5	Ester, polyeter	Vätskor	Ej klassificerat	Ej klassificerat
2-merkaptopyrimidin	1450-85-7	Acylhalid	Fast ämne	Ej klassificerat	Ej klassificerat
Fenylbutazon	50-33-9	Heterocyklisk förening	Fast ämne	Ej klassificerat	Ej klassificerat

▼M7

Kemikalie	CASRN	Kemisk klass ([1])	Fysikalisk form	In vivo-klassificering ([2])	BCOP-klassificering
Polyoxieten-23-lauryleter (BRIJ-35) (10 %)	9002-92-0	Alkohol	Vätska	Ej klassificerat	Ej klassificerat

Förkortningar: CASRN = Chemical Abstracts Service Registry Number

([1]) Varje testkemikalie tilldelades en kemisk klass med användning av ett standardsystem baserat på klassificeringssystemet National Library of Medicine Medical Subject Headings (MeSH) (finns på http//www.nlm.nih.gov/mesh).

([2]) På grundval av in vivo-test på kaninögon (OECD TG 405) och med användning av GHS (17) (4).

([3]) Klassificering i kategori 2A eller 2B beror på tolkningen av GHS-kriteriet för att skilja mellan dessa två kategorier, dvs. 1 av 3 jämfört med 2 av 3 djur med effekter på dag 7, vilket krävs för en klassificering i kategori 2A. In vivo-undersökningen omfattade tre djur. Alla resultatpunkter förutom rodnad konjunktiva hos ett djur återhämtades till noll dag 7 eller tidigare. Det djur som inte hade återhämtat sig fullständigt dag 7 hade en konjunktiv rodnad på 1 (dag 7) som var fullständigt återställd dag 10.

▼M7

Tillägg 4

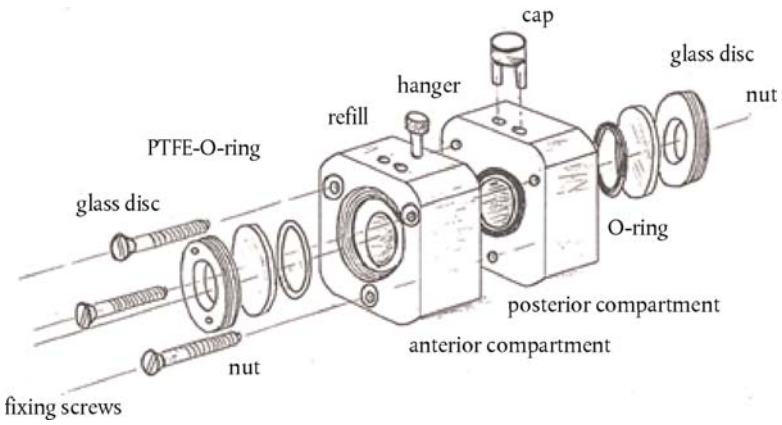
HORNHINNEHÅLLARE FÖR BCOP-TESTMETODEN

Hornhinnehållare för BCOP är gjorda av ett inert material (t.ex. polypropen). De består av två halvor (en främre och en bakre kammare) och har två likadana cylindriska inre kammare. Varje kammare rymmer 5 ml och har ett glasfönster genom vilket opacitetsmätningarna görs. De inre kamrarna mäter 1,7 cm i diameter och 2,2 cm i djup ([1]). Den bakre kammaren har en o-ring för att förhindra läckor. Hornhinnorna placeras med endotelsidan nedåt på den bakre kammarens o-ring och den främre kammaren placeras på hornhinnornas epitelsida. Kamrarna hålls på plats med hjälp av tre rostfria stålskruvar på kammarens ytterkanter. Varje kammare har ett glasfönster som kan tas bort för att enkelt nå hornhinnan. Det finns också en o-ring mellan glasfönstret och kammaren för att förhindra läckor. Upptill på varje kammare finns två hål för att tillsätta och ta bort medium och testkemikalier. Hålen försluts med gummiproppar under behandlings- och inkubationsperioderna. Ljustransmissionen genom hornhinnehållarna kan eventuellt ändras eftersom slitage eller ackumulering av specifika kemikaliska rester på den inre kammarens diameter eller på glasfönstren kan påverka ljusspridningen eller reflektansen. Följden kan bli ökningar eller minskningar i grundvärden för ljustransmission (och omvänt grundvärden för opacitet) genom hornhinnehållarna, och kan vara uppenbar som anmärkningsvärda förändringar i de förväntade grundvärdena vid initiala mätningar av hornhinneopacitet i individuella kammare (dvs, de initiala hornhinneopacitetsvärdena i särskilda individuella hornhinnehållare kan rutinmässigt skilja sig åt med mer än 2 eller 3 opacitetsenheter från de förväntade grundvärdena). Laborationerna bör införa program för att utvärdera ändringar i ljustransmissionen genom hornhinnehållarna, beroende på vilken typ av kemikalier som testas och hur ofta kamrarna används. För att fastställa jämförelsevärden kan man kontrollera hornhinnehållarna före rutinmässig användning genom att mäta grundvärden för opacitet (eller ljustransmission) i kamrarna, fyllda med komplett medium utan hornhinnor. Hornhinnehållarna kontrolleras därefter regelbundet för att upptäcka ändringar i ljustransmissionen under användningsperioderna. Laboratorierna kan fastställa kontrollintervaller för hornhinnehållarna baserat på testade kemikalier, användningsfrekvens och observationer av ändringar i grundvärdena för hornhinnornas opacitet. Om märkbara förändringar i ljustransmissionen genom hornhinnehållarna observeras måste laboratoriet överväga lämpliga rengörings- och/eller poleringsrutiner för hornhinnehållarnas yta eller byta ut hornhinnehållarna.

([1]) De här måtten utgår från hållare för hornhinnor från nötkreatur som är 12–60 månader gamla. För hornhinnor från djur som är 6–12 månader ska hållarna utformas så att varje kammare rymmer en volym på 4 ml och innerkamrarnas diameter är 1,5 cm och djup 2,2 cm. Vid utformningen av anpassade hornhinnehållare är det mycket viktigt att förhållandet mellan exponerad hornhinneyta och bakre kammarens volym är samma som motsvarande förhållande i en traditionell hornhinnehållare. Detta är nödvändigt för att säkerställa att permeabilitetsvärdena fastställs korrekt för beräkningen av IVIS med hjälp av den angivna formeln.

▼M7

Hornhinnehållare: sprängskiss



▼M7

Tillägg 5

OPACITETSMÄTARE

Opacitetsmätaren används för mätning av ljustransmission. För OP-KIT-utrustningen från Electro Design (Riom, Frankrike) som användes för valideringen av BCOP-testmetoden, sänds t.ex. ljus från en halogenlampa sänds genom kontrollkammaren (en tom kammare utan fönster eller vätska) till en fotocell och jämförs med ljuset som sänds genom försökskammaren (i vilken hornhinnan finns) till en fotocell. Instrumentet mäter skillnaden mellan fotocellernas ljustransmission och visar ett numeriskt värde på en digital display. Opacitetsenheterna fastställs. Andra typer av opacitetsmätare med andra inställningar (som t.ex. inte kräver parallella mätningar av kontroll- och försökskamrarna) kan användas om de har visat sig ge samma resultat som den validerade utrustningen.

Opacitetsmätaren bör ge en linjär respons genom ett område av opacitetsmätningar som omfattar de brytpunkter som används för de olika klassificeringar som beskrivs i prognosmodellen (dvs. upp till brytpunkten för frätande verkan/kraftig irritation). För att säkerställa linjära och exakta avläsningar upp till 75–80 opacitetsenheter är det nödvändigt att kalibrera opacitetsmätaren med en serie kalibratorer. Kalibratorerna placeras i kalibreringskammaren (en hornhinnekammare utformad för kalibratorer) och avläsning görs på opacitetsmätaren. Kalibratorerna placeras i kalibreringskammaren med mer eller mindre det avstånd mellan ljus och fotocell som motsvarar hornhinnans placering vid opacitetsmätningarna. Referensvärden och initialt börvärde beror på vilken typ av utrustning som används. Opacitetsmätningars linjäritet bör säkerställas genom lämpliga (instrumentspecifika) förfaranden. För OP-KIT-utrustningen från Electro Design (Riom, Frankrike) kalibreras opacitetsmätaren först till 0 opacitetsenheter med hjälp av kalibreringskammaren utan en kalibrator. Därefter placeras tre olika kalibratorer en i sänder i kalibreringskammaren och avläsning görs av opacitetsvärdena. Kalibratorerna 1, 2 och 3 bör ge opacitetsavläsningar som motsvarar deras riktvärden på 75, 150 respektive 225 opacitetsenheter ± 5 %.

▼M7

B.48 TESTMETODEN ICE (ISOLATED CHICKEN EYE TEST) FÖR IDENTIFIERING AV I) KEMIKALIER SOM ORSAKAR ALLVARLIG ÖGONSKADA OCH II) KEMIKALIER FÖR VILKA DET INTE KRÄVS KLASSIFICERING FÖR ÖGONIRRITATION ELLER ALLVARLIG ÖGONSKADA

INLEDNING

Denna testmetod motsvarar OECD:s testriktlinje (TG) 438 (2013). ICE-testmetoden (Isolated Chicken Eye) utvärderades 2006 and 2010 (1)(2) av amerikanska ICCVAM (*Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods*) tillsammans med Europeiska centret för bestämning av alternativa metoder (ECVAM) och det japanska centret för validering av alternativa metoder (JaCVAM) 1) (2) (3). I den första utvärderingen godkändes ICE som en vetenskapligt giltig testmetod för användning som ett screeningtest för att identifiera kemikalier (ämnen och blandningar) som inducerar allvarlig ögonskada (kategori 1) enligt definitionen i FN:s globala harmoniserade system för klassificering och märkning av kemikalier (GHS) (1) (2) (4) och förordning (EG) 1272/2008 om klassificering, märkning och förpackning av ämnen och blandningar (CLP-förordningen) ([1]). I den andra utvärderingen undersökte man om ICE-testmetoden var användbar som ett screeningtest för att identifiera kemikalier som inte är klassificerade för ögonirritation eller allvarliga ögonskador enligt GHS (3) (4). Enligt resultaten från valideringsstudien och rekommendationerna från den expertpanel som granskat metoden behölls den ursprungliga rekommendationen om att använda ICE för klassificering av kemikalier som inducerar allvarlig ögonskada (GHS-kategori 1), eftersom dem tillgängliga databasen inte ändrats sedan den ursprungliga ICCVAM-rekommendationen. I detta skede föreslås inga ytterligare rekommendationer om att utöka ICE-metodens tillämpningsområde till att även omfatta andra kategorier. En förnyad utvärdering gjordes av de in vitro- och in vivo-datauppsättningar som använts för att bedöma om ICE-metoden är användbar för att identifiera kemikalier som inte kräver klassificering för ögonirritation eller allvarlig ögonskada (5). Denna förnyade utvärdering visade att ICE-testmetoden även kan användas för att identifiera kemikalier som inte kräver klassificering för ögonirritation och allvarlig ögonskada enligt definitionen i GHS (4) (5). Denna testmetod beskriver rekommenderad användning av och begränsningar hos ICE-testmetoden baserat på dessa utvärderingar. De största skillnaderna mellan den ursprungliga versionen från 2009 och den uppdaterade versionen från 2013 av OECD-testriktlinjen avser, men är inte begränsade till, användning av ICE-testmetoden för att identifiera kemikalier som inte kräver klassificering enligt GHS-klassificeringen, en uppdatering av de uppgifter som ska ingå i testrapporten, en uppdatering av tillägg 1 om definitioner och en uppdatering av tillägg 2 om kvalifikationskemikalier.

Det är allmänt vedertaget att inget ögonirritationstest in vitro inom överskådlig framtid kommer att kunna ersätta Draizes ögontext in vivo för att förutsäga alla typer av ögonirritation för olika kemiska klasser. Strategiska kombinationer av flera alternativa testmetoder inom ramen för en (differentierad) teststrategi kan dock ersätta Draizes ögontest (6). Uppifrån och ned-strategin (7) är utformad för att användas när en kemikalie förväntas vara mycket irriterande baserat på befintlig information, medan botten-upp-strategin (7) å sin sida är utformad för att användas när en kemikalie inte förväntas orsaka tillräcklig ögonirritation för att kräva en klassificering baserat på befintlig information. ICE-testmetoden är en testmetod in vitro som kan användas under vissa omständigheter och med särskilda begränsningar (som beskrivs i punkterna 8–10) för klassificering och märkning av kemikalier som är farliga för ögonen. ICE-testmetoden anses i sig inte vara en giltig ersättning för test på kaninögon in vivo, men rekommenderas som ett första steg i en teststrategi såsom den uppifrån och ned-strategi som föreslagits av Scott m.fl. (7) För att identifiera kemikalier som inducerar allvarlig

([1]) Europaparlamentets och rådets förordning (EG) nr 1272/2008 av den 16 december 2008 om klassificering, märkning och förpackning av ämnen och blandningar, ändring och upphävande av direktiven 67/548/EEG och 1999/45/EG samt ändring av förordning (EG) nr 1907/2006 (EUT L 353, 31.12.2008, s. 1).

▼M7

ögonskada, dvs. kemikalier som klassificeras som GHS-kategori 1, utan ytterligare provning (4). ICE-testmetoden rekommenderas också för att identifiera kemikalier som inte kräver klassificering för ögonirritation eller allvarlig ögonskada enligt definitionen i GHS (GHS ingen klassificering, NC) (4) och kan därför användas som ett första steg i en teststrategi som botten-upp-strategin (7). Kemikalier som inte förutsägs orsaka allvarlig ögonskada eller inte klassificeras för ögonirritation/allvarlig ögonskada enligt ICE-testmetoden kräver dock ytterligare testning (in vitro och/eller in vivo) för att fastställa en definitiv klassificering. Dessutom bör berörda tillsynsmyndigheter rådfrågas innan man använder ICE-metoden inom ramen för en botten-upp-strategi enligt andra klassificeringssystem än FN:s GHS.

Syftet med denna testmetod är att beskriva de förfaranden som används för att utvärdera om kemikalien kan vara skadlig för ögonen, mätt som kemikaliens förmåga att inducera toxicitet eller ej i ett isolerat kycklingöga. De toxiska verkningarna på hornhinnan mäts genom i) kvalitativ bedömning av opacitet, ii) kvalitativ bedömning av skadan på epitel efter applicering av fluorescein på ögat (fluoresceinfärgning), iii) kvantitativ mätning av ökad tjocklek (svullnad) och iv) kvalitativ utvärdering av makroskopisk morfologisk skada på ytan. Korneal opacitet, svullnad och skadebedömning efter exponering för en testkemikalie utvärderas var för sig och kombineras till ett resultat som används för klassificering av ämnet med avseende på ögonirritation.

Definitioner av begreppen finns i tillägg 1.

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN OCH BEGRÄNSNINGAR

Testmetoden baserar sig på det protokoll som föreslås i OECD:s vägledningsdokument 160 (8) som har tagits fram enligt ICCVAM:s internationella valideringsstudie (1) (3) (9), med bidrag från Europeiska centret för bestämning av alternativa metoder (ECVAM), det japanska centret för validering av alternativa metoder (JaCVAM) och TNO Quality of Life Department of Toxicology and Applied Pharmacology (Nederländerna). Protokollet grundar sig på uppgifter från offentliggjorda protokoll och från det protokoll som för närvarande används av TNO (10) (11) (12) (13) (14).

En omfattande mängd olika kemikalier har testats vid den validering som ligger till grund för denna testmetod och valideringsstudiens empiriska databas uppgick till totalt 152 kemikalier, inklusive 72 ämnen och 80 blandningar (5). Testmetoden är tillämplig på fasta ämnen, vätskor, emulsioner och geler. Vätskorna kan vara vattenbaserade eller icke-vattenbaserade och de fasta ämnena kan vara vattenlösliga eller icke-vattenlösliga. Gaser och aerosoler har ännu inte bedömts genom valideringsstudier.

ICE-testmetoden kan användas för att identifiera kemikalier som inducerar allvarlig ögonskada, dvs. kemikalier som klassificeras som GHS-kategori 1 (4). När den används för detta syfte baserar de identifierade begränsningarna för ICE-testmetoden sig på höga falska positiva värden för alkoholer och höga falska negativa värden för fasta ämnen och ytaktiva ämnen (1) (3) (9). Falska negativa värden är dock inte kritiska i detta sammanhang (GHS-kategori 1, identifierade som inte tillhörande GHS-kategori 1), eftersom alla testkemikalier som ger ett negativt resultat därefter testas med andra lämpligt validerade in vitro-test och som ett sista alternativ på kaniner, beroende på kraven i tillämpliga bestämmelser, med tillämpning av en strategi med stegvis testning enligt principen om sammanvägd bedömning Det bör noteras att fasta ämnen kan leda till varierande

▼M7

och extrema exponeringsförhållanden i Draizes ögonirritationstest in vivo, vilket i sin tur kan leda till irrelevanta förutsägelser om ämnets verkliga irritationspotential (15). Forskare kan överväga att använda denna testmetod för alla kemikalier. I ett sådant fall bör ett positivt resultat godtas som en indikation allvarlig ögonskada, dvs. klassificering i GHS-kategori 1 utan ytterligare testning. Positiva resultat från test med alkoholer bör dock tolkas försiktigt på grund av risken för överprediktion.

När ICE-testmetoden används för att identifiera kemikalier som ger upphov till allvarlig ögonskada (GHS-kategori 1) har den en övergripande noggrannhet på 86 % (120/140), ett falskt positivt värde på 6 % (7/113) och ett falskt negativt värde på 48 % (13/27) jämfört med in vivo-testning på kaninögon enligt klassificeringssystemet GHS (4) (5).

ICE-testmetoden kan också användas för att identifiera kemikalier som inte kräver klassificering för ögonirritation eller allvarlig ögonskada enligt GHS-klassificeringssystemet (4). Berörda tillsynsmyndigheter bör rådfrågas innan man använder ICE-metoden inom ramen för en botten-upp-strategi enligt andra klassificeringssystem. Denna testmetod kan användas för alla typer av kemikalier, och ett negativt resultat kan godtas för att inte klassificera en kemikalie för ögonirritation och allvarlig ögonskada. På grundval av ett resultat från valideringsdatabasen kan organiska lösningsmedel med antifoulingeffekt som innehåller färg dock vara underskattade (5).

När ICE-testmetoden används för att identifiera kemikalier som inte kräver klassificering för ögonirritation och allvarlig ögonskada har de en övergripande noggrannhet på 82 % (125/152), ett falskt positivt värde på 33 % (26/79) och ett falskt negativt värde på 1 % (1/73) jämfört med data från metoden för in vivo-testning på kaninögon enligt GHS (4) (5). När testkemikalier inom vissa klasser (t.ex. organiska lösningsämnen med antifoulingeffekt som innehåller färg) undantas från databasen har ICE-testmetoden en noggrannhet på 83 % (123/149), ett falskt positivt värde på 33 % (26/78) och ett falskt negativt värde på 0 % (0/71) enligt GHS (4) (5).

ICE-testmetoden rekommenderas inte för identifiering av testkemikalier som bör klassificeras som irriterande för ögonen (dvs. GHS-kategori 2 eller 2A) eller testkemikalier som bör klassificeras som måttligt irriterande för ögonen (GHS-kategori 2b), eftersom det finns ett stort antal kemikalier i GHS-kategori 1 som är underklassificerade som GHS-kategori 2, 2A eller 2B medan andra kemikalier i GHS-kategorin Ingen klassificering är överklassificerade som GHS-kategori 2, 2A eller 2B. Därför kan det krävas ytterligare testning med en annan passande metod.

Alla förfaranden som omfattar ögon från kycklingar bör respektera testningslaboratoriets tillämpliga regler och förfaranden för hantering av material som kommer från människor eller djur, omfattande men inte begränsat till vävnader och vävnadsvätskor. Likaså rekommenderas allmänna försiktighetsåtgärder för laboratorier (16).

ICE-testmetoden beaktar inte skador på ögats bindhinna (konjunktiva) eller iris, vilka utvärderas enligt testmetoden för öronirritation hos kaniner, men däremot skador på hornhinnan, som är den viktigaste in vivo-klassificeringen med avseende på FN:s GHS-klassificering. Dessutom gäller att även om reversibiliteten hos hornhinneskador i sig inte kan utvärderas vid ICE-test, har det på grundval av studier av kaninögon föreslagits att en bedömning av det initiala djupet för

▼M7

hornhinneskada kan användas för att identifiera vissa typer av irreversibla effekter (17). Det krävs i synnerhet ytterligare vetenskaplig kunskap för att man ska kunna förstå hur irreversibla effekter som inte är kopplade till en initialt allvarlig skada kan uppstå. Slutligen gäller att ICE inte ger möjlighet att bedöma potentialen för systemisk toxicitet associerad med okulär exponering.

Denna testmetod kommer att uppdateras regelbundet allteftersom ny information och data övervägs. Till exempel kan histopatologi vara potentiellt användbart när det behövs en mer fullständig karakterisering av skador på hornhinnan. För att utvärdera denna möjlighet uppmuntras användarna att bevara ögon och bereda histopatologiska prover som kan användas för att utveckla en databas och beslutskriterier för att ytterligare förbättra metodens noggrannhet. OECD har tagit fram ett vägledningsdokument om användning av okulära toxicitetsmetoder in vivo, som innehåller detaljerade förfaranden om insamling av histopatologiska prover och information om var prover och/eller histopatologiska data ska lämnas in (8).

Laboratorier som tar denna testmetod i bruk för första gången bör använda de kvalifikationskemikalier som förtecknas i tillägg 2. Ett laboratorium kan använda dessa kemikalier för att påvisa sin tekniska kompetens att genomföra ICE-testmetoden innan laboratoriet lämnar in ICE-testdata avsedda för lagstadgad faroklassificering.

TESTPRINCIP

ICE-testmetoden är en organotypisk modell enligt vilken kycklingögon under kort tid bibehåller normal fysiologisk och biokemisk funktion in vitro. Med denna testmetod utvärderas den skada som framkallats av testkemikalien genom bestämning av hornhinnans svullnad, opacitet och fluoresceinfärgning. De två senare parametrarna bedöms kvalitativt medan analysen av hornhinnans svullnad görs kvantitativt. Varje mätning konverteras till ett kvantitativt värde som används för att kalkylera ett övergripande irritationsindex eller för att tilldela en kvalitativ kategorisering som används för att fastställa en klassificering in vitro av kemikalier som är farliga för ögonen, antingen som GHS-kategori 1 eller GHS ingen klassificering. Dessa resultat kan sedan användas för att förutsäga risken för allvarlig ögonskada in vivo eller om testkemikalien inte behöver klassificeras som farlig för ögonen (se beslutskriterierna). Kemikalier som inte förutsägs orsaka allvarlig ögonskada eller inte klassificeras med ICE-testmetoden kan dock inte klassificeras (se punkt 11).

Källa och ålder för kycklingögon

I regel används ögon tillvaratagna från kycklingar som kommer från ett slakteri där de avlivats för användning som livsmedel, vilket eliminerar behovet av försöksdjur. Endast ögon från friska djur som anses lämpliga för livsmedelskedjan får användas.

Det har inte gjorts någon kontrollerad undersökning för att utvärdera optimal ålder för kycklingarna för testmetoden, men i regel används kycklingar som slaktats på vanligt sätt i ett fjäderfäslakteri (cirka 7 veckor gamla, 1,5–2,5 kg).

Tillvaratagande och transport av ögon till laboratoriet

Kycklingarnas huvuden ska avlägsnas omedelbart efter bedövning (i regel med elchock) med snitt i halsen för blödning. Kycklinghuvudena bör komma från en lokal källa nära laboratoriet så att de tillräckligt snabbt kan transporteras från slakteriet till laboratoriet för att minimera risken för skador och/eller bakterieförorening. Tidsintervallet mellan tillvaratagandet av kycklinghuvudena och placeringen av ögonen i superfusionsapparatens kammare efter isolering bör minimeras (i regel högst två timmar) för att säkerställa att försökskriterierna är uppfyllda. Alla ögon som används för testning bör komma från samma grupp av ögon som har tillvaratagits på en viss dag.

▼M7

Ögonen avlägsnas i laboratoriet, och de orörda kycklinghuvudena ska därför transporteras från slakteriet vid rumstemperatur(normalt 18–25 °C) i plastlådor som fuktas med pappershanddukar indränkta i fysiologisk koksaltlösning.

Urvalskriterier och antal ögon som används för ICE-test

Ögon med högt grundvärde för fluoresceinfärgning (> 0,5) eller korneal opacitet (> 0,5) efter tillvaratagandet ska förkastas.

Varje behandlingsgrupp med parallell positiv kontroll består av minst tre ögon. Den negativa kontrollgruppen eller lösningsmedelskontrollen (om annat lösningsmedel än saltlösning används) ska bestå av minst ett öga.

När det gäller fasta material som leder till ett GHS NC-resultat rekommenderas en andra provomgång för att bekräfta eller avvisa det negativa resultatet.

FÖRFARANDE

Förberedelse av ögonen

Ögonlocken skärs bort försiktigt med undvikande av skador på hornhinnan. Hornhinnans intakta skick kan utvärderas snabbt med en droppe 2 % natriumfluorescein (vikt/volym) som appliceras på hornhinnans yta för några sekunder och därefter sköljs bort med fysiologisk koksaltlösning. De fluoresceinbehandlade ögonen undersöks därefter med spaltlampa för att kontrollera att hornhinnan är intakt (värdet för fluoresceinfärgning och korneal opacitet ≤ 0,5).

Förutsatt att hornhinnan är intakt skärs ögat ut från skallen med varsamhet så att hornhinnan inte skadas. Ögongloben dras ut ur ögonhålan med ett stadigt grepp om blinkhinnan med hjälp av kirurgisk tång och ögonmusklerna klipps av med en böjd trubbig sax. Det är viktigt att greppet om hornhinnan inte är så starkt att det uppstår skador (t.ex. kompressionsartefakter).

När ögat har tagits ut ur hålan bör det finnas kvar en vidfäst synlig del av synnerven. Därefter placeras ögat på ett absorberande underlag och blinkhinnan och annan bindvävnad skärs bort.

Därefter monteras ögat i en klämma av rostfritt stål med hornhinnan i upprätt riktning. Klämman med ögat överförs till superfusionsapparaten (18). Klämmorna ska placeras i superfusionsapparaten så att droppet med fysiologisk koksaltlösning når hela hornhinnan (3–4 droppar per minut eller 0,1–0,15 ml/min.). Superfusionsapparatens kammare ska ha en kontrollerad temperatur på 32 ± 1,5 °C. I tillägg 3 finns en schematisk bild av en typisk superfusionsapparat med ögonklämmor. Utrustningen kan anskaffas kommersiellt eller konstrueras i laboratoriet. Apparaten kan också anpassas efter behoven vid ett enskilt laboratorium (t.ex. för att hålla ett avvikande antal ögon).

Efter att ögonen placerats i superfusionsapparaten granskas de på nytt med spaltlampa för att kontrollera att de inte har fått skador under dissektionen. Samtidigt ska även hornhinnans tjocklek mätas vid hornhinnans apex med hjälp av spaltlampans tillbehör för djupmätning. Ögon som har i) fluoresceinfärgningsvärde > 0,5, ii) värde för korneal opacitet > 0,5 eller iii) andra tecken på skada ska bytas ut. Ögon som inte har förkastats enligt något av dessa kriterier men där hornhinnans tjocklek avviker mer än 10 % från medelvärdet för alla ögon ska förkastas. Det är viktigt att vara medveten om att spaltlampan kan ge olika värden på hornhinnans tjocklek beroende på inställningen för spaltbredd. Spaltbredden ska ställas in på 0,095 mm.

▼M7

Undersökta och godkända ögon inkuberas i cirka 45–60 minuter för att få dem i jämvikt med testsystemet före doseringen. Efter jämviktsperioden görs en referensmätning av hornhinnans tjocklek och opacitet för att få ett grundvärde (tid = 0). Fluoresceinvärdet som uppmättes vid dissektionen används som grundvärde för denna endpoint.

Applicering av testkemikalien

Omedelbart efter mätningarna av nollreferens tas ögonen (i sina hållare) bort ur superfusionsapparaten, placeras i liggande läge och testkemikalien appliceras på hornhinnan.

Vätskeformiga testkemikalier används i regel i outspädd form men kan spädas ut om det bedöms vara nödvändigt (t.ex. som en del av försöksutformningen). Eventuell utspädning ska helst göras med fysiologisk koksaltlösning. Andra lösningsmedel än fysiologisk koksaltlösning kan användas under kontrollerade förhållanden men då bör lämpligheten påvisas.

Vätskeformiga testkemikalier appliceras på hornhinnan så att hela ytan är jämnt täckt med testkemikalien (standardvolymen är 0.03 ml).

Fasta testkemikalier ska så långt det är möjligt finfördelas i mortel eller motsvarande redskap. Pulvret appliceras så att hornhinnan blir jämnt täckt med testkemikalien. Standardmängden är 0,03 g.

Testkemikalien (vätska eller fast ämne) får verka på hornhinnan i 10 sekunder och sköljs sedan bort från ögat med rumstempererad fysiologisk koksaltlösning (cirka 20 ml). Ögat (i sin hållare) återförs därefter till superfusionsapparaten i ursprunglig upprätt position. Vid behov kan en ytterligare sköljning göras efter 10 sekunders applicering och vid olika tidpunkter därefter (t.ex. om man upptäcker rester av testkemikalien på hornhinnan). I regel är den mängd saltlösning som används för sköljning inte en kritisk faktor, men det är viktigt att kontrollera att kemikalien fäster vid hornhinnan.

Kontrollkemikalier

Parallella negativa kontroller eller lösningsmedels-/vehikelkontroller och positiva kontroller ska ingå i varje försök.

Vid testning av outspädda vätskor eller fasta ämnen med ICE-testmetoden ska fysiologisk koksaltlösning användas som parallell negativ kontroll för att upptäcka icke-specifika ändringar i testsystemet och för att säkerställa att testningsförhållandena inte i onödan framkallar irritation.

Vid testning av utspädda vätskor ska en parallell negativ kontrollgrupp för lösningsmedel/vehikel inbegripas för att upptäcka icke-specifika ändringar i testsystemet och för att säkerställa att testningsförhållandena inte i onödan framkallar irritation. Som det konstateras i punkt 31 får endast lösningsmedel/vehikel som påvisbart inte har negativa effekter på testsystemet användas.

Ett känt ögonirriterande ämne ska ingå som parallell positiv kontroll i varje försök för att bekräfta att rätt slags respons framkallas. Eftersom ICE används i denna testmetod för att identifiera frätande eller kraftigt irriterande ämnen, ska den positiva kontrollen göras med en referenskemikalie som framkallar kraftig respons. För att säkerställa att den positiva kontrollresponsens variationer över

▼M7

tiden kan bedömas, bör den kraftiga irritation som framkallas inte vara för stark. Tillräckliga in vitro-data bör genereras för den positiva kontrollen så att det går att beräkna ett godtagbart intervall för denna. Om det inte finns tillbörliga historiska ICE-testmetodsdata för en särskild positiv kontroll måste man eventuellt genomföra försök för att få fram denna information.

Exempel på positiva kontroller för vätskeformiga testkemikalier är 10 % ättiksyra eller 5 % bensalkoniumklorid, och exempel på positiva kontroller för fasta testkemikalier är natriumhydroxid eller imidazol.

Referenskemikalier kan användas för utvärdering av förmågan att framkalla ögonirritation hos okända kemikalier tillhörande en specifik kemisk klass eller produktklass, eller för utvärdering av den relativa irritationspotentialen hos ett ögonirriterande ämne inom ett specifikt responsområde.

Mätning av endpoints

Hornhinnorna utvärderas före behandlingen och vid 30, 75, 120, 180 och 240 minuter (± 5 minuter) efter den sköljning som görs efter behandlingen. Dessa tidpunkter ger ett tillbörligt antal mätningar under den fyra timmar långa behandlingsperioden och ger tillräckligt med tid mellan mätningarna för att genomföra observationerna av alla ögon.

De endpoints som ska bedömas är korneal opacitet, svullnad, fluoresceinfärgning och morfologiska effekter (t.ex. gropbildning eller avlossning av epitel). Alla endpoints, med undantag av fluoresceinfärgning (som endast bestäms före behandlingen och 30 minuter efter exponering av testkemikalien) bestäms vid alla de ovan nämnda tidpunkterna.

Fotografier rekommenderas för dokumentering av korneal opacitet, fluoresceinfärgning, morfologiska verkningar och, i förekommande fall, histopatologi.

Efter den sista granskningen vid tidpunkten fyra timmar är det rekommendabelt att hålla ögonen i lämpligt konserveringsmedel (t.ex. neutralt formalin med buffert) med tanke på eventuell histopatologisk undersökning (se punkt 14 och hänvisning 8 för närmare uppgifter).

Hornhinnans svullnad bestäms genom mätningar av hornhinnans tjocklek med en pachymeter eller spaltlampa. Svullnaden uttrycks som ett procenttal och beräknas på grundval av mätningarna enligt följande formel:

$$\left(\frac{\textit{hornhinnans tjocklek vid tiden } t - \textit{hornhinnans tjocklek vid tiden} = 0}{\textit{hornhinnans tjocklek vid tiden} = 0} \right) \times 100$$

Medelvärdet för hornhinnans svullnad för alla testögon beräknas för alla observationstidpunkter. Det högsta medelvärdet för svullnad oavsett observationstidpunkt används som grund för en övergripande kategorisering av testkemikalien (se punkt 51).

Den korneala opaciteten utvärderas på grundval av mätningarna på det område av hornhinnan som har den tätaste opaciteten enligt tabell 1. Medelvärdet för den korneala opaciteten för alla testögon beräknas för alla observationstidpunkter. Det högsta medelvärdet för korneal opacitet oberoende av tidpunkt används som grund för en övergripande kategorisering av testkemikalien (se punkt 51).

▼M7

Tabell 1

Värden för korneal opacitet.

Gradering	Observation
0	Ingen opacitet.
0,5	Mycket svag opacitet.
1	Spridda eller diffusa områden med opacitet, alla detaljer i iris är klart synliga.
2	Enkelt skönjbart translucent område, detaljerna i iris är lätt förmörkade.
3	Kraftig korneal opacitet, inga detaljer i iris är synliga, pupillens storlek kan knappat urskiljas.
4	Fullständig korneal opacitet, iris syns inte.

Fluoresceinfärgningen utvärderas efter 30 minuters observationstid enligt tabell 2. Medelvärdet för fluoresceinfärgning för alla testögon beräknas därefter för observationstidpunkten 30 minuter och används för övergripande kategorivärde som ges för varje testkemikalie (se punkt 51).

Tabell 2

Värden för fluoresceinfärgning.

Gradering	Observation
0	Ingen fluoresceinfärgning.
0,5	Mycket svag färgning av enskilda celler.
1	Färgning av enskilda celler spridda över hornhinnans behandlade yta.
2	Fokal eller konfluent tät färgning av enskilda celler.
3	Konfluenta stora områden av hornhinnan har färgats av fluorescein

Till de morfologiska effekterna hör gropbildning i hornhinnans epitel, avlossning av epitel, uppruggning av hornhinnans yta och vidfästning av testkemikalien vid hornhinnan. Dessa observationer kan ha olika allvarlighetsgrad och kan förekomma samtidigt. Klassificeringen av observationerna är subjektiva och beror på personlig tolkning.

DATA OCH RAPPORTERING

Utvärdering av data

Resultaten för korneal opacitet, svullnad och fluoresceinfärgning bör utvärderas separat för att ge en ICE-klass för varje endpoint. ICE-klasserna för varje endpoint kombineras därefter, så att man får en klassificering av varje testkemikalie med avseende på irritationsframkallande egenskaper.

Beslutskriterier

Efter att varje endpoint har utvärderats kan ICE-klasser tilldelas i enlighet med en på förhand fastställd skala. Tolkningen av hornhinnans svullnad (tabell 3), opacitet (tabell 4) och fluoresceinfärgning (tabell 5) med användning av fyra ICE-klasser görs enligt de skalor som visas nedan. Det är viktigt att notera att de värden för hornhinnans svullnad som anges i tabell 3 endast gäller om tjockleken

▼M7

mäts med en spaltlampa (t.ex. Haag-Streit BP900) med djupmätanordning nr 1 och spaltbredd på $9\frac{1}{2}$, motsvarande 0,095 mm. Det är viktigt att vara medveten om att spaltlampan kan ge olika värden på hornhinnans tjocklek beroende på inställningen för spaltbredd.

Tabell 3

ICE-klassificeringskriterier för hornhinnans svullnad.

Medelvärde för svullnad (%) (*)	ICE-klass
0 till 5	I
> 5 till 12	II
> 12 till 18 (> 75 min. efter behandling)	II
> 12 till 18 (≤ 75 min. efter behandling)	III
> 18 till 26	III
> 26 till 32 (> 75 min. efter behandling)	III
> 26 till 32 (≤ 75 min. efter behandling)	IV
> 32	IV

(*) Högsta medelvärde som observerats vid någon tidpunkt.

Tabell 4

ICE-klassificeringskriterier för opacitet.

Medelvärde för högsta opacitet (*)	ICE-klass
0,0–0,5	I
0,6–1,5	II
1,6–2,5	III
2,6–4,0	IV

(*) Högsta medelvärde som observerats vid någon tidpunkt (baserat på opacitetsvärden enligt tabell 1).

Tabell 5

ICE-klassificeringskriterier för fluoresceinfärgning.

Medelvärde för fluoresceinfärgning 30 minuter efter behandlingen (*)	ICE-klass
0,0–0,5	I
0,6–1,5	II
1,6–2,5	III
2,6–3,0	IV

(*) Baserat på poäng som anges i tabell 2.

Testkemikaliens övergripande klassificering in vitro bedöms genom avläsning av den GHS-klassificering som motsvarar kombinationen av kategorier för hornhinnan i fråga om svullnad, korneal opacitet och fluoresceinfärgning enligt beskrivningen i tabell 6.

▼M7

Tabell 6

Övergripande in vitro-klassificeringar.

Klassificering enligt FN GHS	Kombinationer av tre endpoints
Ingen klassificering	3 × I 2 × I, 1 × II
Ingen förutsägelse kan göras	Andra kombinationer
Kategori 1	3 × IV 2 × IV, 1 × III 2 × IV, 1 × II (*) 2 × IV, 1 × I (*) Korneal opacitet ≥ 3 vid 30 min. (minst två ögon) Korneal opacitet = 4 oavsett tidpunkt (minst två ögon) Kraftig avlossning av epitel (minst ett öga)

(*) Kombinationer som är mindre sannolika.

Kriterier för godkännande av ett försök

Testet anses godtagbart om de parallella negativa kontrollerna eller vehikel-/lösningsmedelskontrollerna och de parallella positiva kontrollerna identifieras som GHS ingen klassificering respektive GHS-kategori 1.

Testrapport

Testrapporten ska innehålla följande uppgifter i den mån de är relevanta:

Testkemikalie och kontrollkemikalier

— Kemisk beteckning såsom den strukturella beteckning som används i Chemical Abstracts Service (CAS) och eventuella andra kända beteckningar

— CAS-registernummer (RN), om det är känt.

— Test-/kontrollkemikaliens renhet och sammansättning (viktprocent) i den mån uppgifterna finns att tillgå.

— Fysikalisk-kemiska egenskaper, t.ex. fysikaliskt tillstånd, flyktighet, pH, stabilitet, kemisk klass och vattenlöslighet, i den mån de är relevanta.

— Behandling av test-/kontrollämnen före testning, om detta är tillämpligt (t.ex. uppvärmning, finfördelning).

— Stabilitet, om den är känd.

Uppgifter om sponsor och testanläggning

— Namn och adress för sponsor, testanläggning och försöksledare.

— Angivelse av ögonkällan (t.ex. den anläggning där ögonen togs till vara).

Testmetodens betingelser

— Beskrivning av testsystemet.

▼M7

— Spaltlampa (t.ex. modell) och instrumentinställningar för detta.

— Hänvisning till historiska negativa och positiva kontrollresultat och, i förekommande fall, historiska data som visar godtagbara parallella intervaller för referenskontroller.

— Det förfarande som används för att säkerställa testmetodens integritet (dvs. noggrannhet och tillförlitlighet) över tiden (t.ex. periodisk testning med kvalifikationskemikalier).

Insamling och förberedelse av ögon

— Ålder och vikt för djuren och om möjligt, andra specifika egenskaper för de djur från vilka ögonen togs till vara.

— Lagrings- och transportförhållanden för ögonen (t.ex. datum och tidpunkt för insamling, tidsintervall mellan insamling av kycklinghuvuden och placering av de isolerade ögonen i superfusionskammaren).

— Förberedelse och montering av de ögon som använts, inbegripet utlåtanden om deras kvalitet, temperatur för ögonkammare samt urvalskriterier för de ögon som valts ut för testning.

Testförfarande

— Antal använda replikat.

— Uppgift om använda negativa och positiva kontroller (i förekommande fall även lösningsmedel och referenskontroller).

— Testkemikaliens dos, applicering och exponeringstid.

— Observationstidpunkter (före och efter behandling).

— Beskrivning av utvärderings- och beslutskriterierna.

— Beskrivning av acceptanskriterierna för undersökningen.

— Beskrivning av eventuella modifieringar av försöksförfarandet.

Resultat

— Data i tabellform över värden för svullnad av hornhinnan, opacitet och fluoresceininfärgning som erhållits för varje öga vid varje observationstidpunkt, inklusive medelvärden vid varje observationstidpunkt för samtliga testade ögon.

— Det högsta observerade medelvärdet för svullnad av hornhinnan, opacitet och fluoresceininfärgning (vid alla tidpunkter) samt relaterad ICE-klass.

— Beskrivning av eventuella andra observerade verkningar.

— Härledd in vitro GHS-klassificering.

— Fotografier av ögat, om det är lämpligt.

Diskussion av resultaten.

Slutsats

▼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. Finns 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. Finns 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. Finns på http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/MildMod-TMER.htm.

(4) Förenta nationerna (FN) (2011). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), fjärde reviderade utgåvan, FN New York och Genève, 2011. Finns 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 nr 188 (del 1 och 2), OECD, Paris.

(6) Kapitel B.5 i denna bilaga, Akut ögonirritation/korrosion.

(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 nr 160, OECD, Paris.

(9) ICCVAM. (2006). Background review document: Current Status of *In Vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Isolated Chicken Eye Test Method. NIH Publication No.: 06-4513. Research Triangle Park: National Toxicology Program. Finns på http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_ice.htm.

(10) Prinsen, M.K. och 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. Finns på http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/.

(12) Balls, M., Botham, P.A., Bruner, L.H. och 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. och 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. och Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (2007). Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings. Finns på http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/isolation2007.pdf.

(17) Maurer, J.K., Parker, R.D. och 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 och R.S. Lawrence (1981). The *in vitro* assessment of severe irritants. *Fd. Cosmet.– Toxicol.*– 19, 471–480.

▼M7

Tillägg 1

DEFINITIONER

Noggrannhet: Ett mått på hur väl testmetodresultaten och de godtagna referensvärdena överensstämmer med varandra. Den är ett mått på testmetodens prestanda och relevansaspekt. Detta begrepp används ofta omväxlande med ”konkordans” för att beskriva andelen korrekta resultat med en testmetod (38).

Referenskemikalie: En kemikalie som används som en standard för jämförelse med en testkemikalie. En referenskemikalie bör ha följande egenskaper: i) en eller flera enhetliga och tillförlitliga källor, ii) strukturell och funktionell likhet med den ämnesklass som testas, iii) kända fysikalisk-kemiska egenskaper, iv) stödjande data om kända effekter och v) känd styrka inom det önskade responsområdet.

Botten-upp-strategi: stegvis metod som tillämpas på kemikalier som inte tros kräva klassificering för ögonirritation eller allvarlig ögonskada. Det första steget är att skilja kemikalier som inte behöver klassificeras (negativt utfall) från andra kemikalier (positivt utfall).

Kemikalie: ett ämne eller en blandning.

Hornhinna (kornea): den transparenta delen på ögonglobens framsida som täcker iris och pupillen och släpper igenom ljus in i ögat.

Korneal opacitet: mått för den grad av opacitet som hornhinnan har efter exponering för en testkemikalie. Ökad korneal opacitet tyder på skador på hornhinnan.

Svullnad av hornhinnan: en objektiv mätning vid ICE-test av hur mycket hornhinnan sväller efter exponering för en testkemikalie. Den uttrycks som ett procenttal och beräknas utifrån ett grundvärde som fås vid mätning av hornhinnans tjocklek före exponering och den tjocklek som uppmäts med regelbundna intervaller efter exponering för testkemikalien. Graden av svullnad är en indikation på skadan på hornhinnan.

Ögonirritation: Ändringar som uppstår i ögat efter applicering av testkemikalien på ögats främre yta och som inte är fullt reversibla inom 21 dagar från appliceringen. Utbytbart mot ”Reversibla effekter på ögat” och ”GHS kategori 2” (4).

Falskt negativt värde: den andel av alla positiva ämnen som av en testmetod felaktigt identifieras som negativ. Det är en indikator på testmetodens prestanda.

Falskt positivt värde: den andel av alla negativa (icke-aktiva) ämnen som av en testmetod felaktigt identifieras som positiva. Det är en indikator på testmetodens prestanda.

Fluoresceinfärgning:: en subjektiv mätning vid ICE-test av den mängd natriumfluorescein som hornhinnans epitelceller håller kvar efter exponering för ett testämne. Mängden fluorescein som hålls kvar är en indikation på skada på hornhinnan.

Fara: inneboende egenskap hos ett ämne eller en situation som har potential att orsaka skadliga effekter när en organism, ett system eller en (del)population exponeras för ämnet.

Irreversibla effekter på ögat: se ”Allvarlig ögonskada” och ”GHS kategori 1”.

▼M7

Blandning: En blandning eller en lösning som består av två eller flera ämnen i vilken de inte reagerar (4)

Negativ kontroll: ett obehandlat replikat som innehåller alla komponenter i ett testsystem. Detta prov hanteras tillsammans med testkemikaliebehandlade prover och andra kontrollprover för att avgöra huruvida lösningsmedlet påverkar testsystemet.

Ej klassificerad: Ämnen som inte är klassificerade som ögonirriterande (GHS-kategori 2) eller för allvarlig ögonskada (GHS-kategori 1). Utbytbart mot ”GHS Ingen klassificering”.

Positiv kontroll: ett replikat som innehåller testsystemets alla komponenter och behandlas med en kemikalie som veterligen inducerar positiv respons. För att säkerställa att den positiva kontrollresponsens variationer kan bedömas över tiden, bör den kraftiga irritation som framkallas inte vara för stark.

Tillförlitlighet: mått på i vilken utsträckning en testmetod kan reproduceras inom och mellan laboratorier över tiden när den utförs med hjälp av samma protokoll. Tillförlitligheten bedöms genom att man beräknar reproducerbarheten inom och mellan laboratorier och repeterbarheten inom laboratorier.

Irreversibla effekter på ögat: se ”Ögonirritation” och ”GHS kategori 2”.

Allvarliga ögonskador: vävnadsskada i ögat eller kraftig synnedsättning som uppstår efter applicering av en testkemikalie på ögats främre yta och som inte är fullt reversibel inom 21 dagar från appliceringen (2). Utbytbart mot ”Irreversibla effekter på ögat” och ”GHS kategori 1” (4).

Spaltlampa: ett instrument som används för direkt undersökning av ögat under förstoring genom ett binokulärt mikroskop och som visar en stereoskopisk, topografisk bild. Vid ICE-test används instrumentet för att granska kycklingögats främre struktur och för objektiv mätning av hornhinnans tjocklek med tillbehöret för mätning av djup.

Lösningsmedels-/vehikelkontroll: ett obehandlat prov som innehåller testsystemets alla komponenter, inbegripet lösningsmedlet eller vehikeln som behandlas tillsammans med testkemikaliebehandlade prover och andra kontrollprover i syfte att fastställa bakgrundsrespons för de prover som behandlas med testkemikalien upplöst i samma lösningsmedel eller vehikel. När detta prov testas med en parallell negativ kontroll, visar provet också huruvida lösningsmedlet eller vehikeln påverkar testsystemet.

Ämne: kemiska grundämnen och deras föreningar i naturlig eller framställd form, inklusive eventuella tillsatser nödvändiga för att bevara produktens stabilitet och sådana föroreningar som härrör från framställningsprocessen, men exklusive eventuella lösningsmedel som kan avskiljas utan att det påverkar ämnets stabilitet eller ändrar dess sammansättning (4).

Ytaktivt ämne: Ett ämne, såsom ett rengöringsmedel, som kan minska en vätskas ytspänning så att lödder bildas eller fasta ämnen penetrerar. Även kallat tensid eller vätmedel.

▼M7

Uppifrån och ned-strategi: stegvis metod som tillämpas på kemikalier som misstänks orsaka allvarlig ögonskada. Det första steget är att skilja kemikalier som inducerar allvarlig ögonskada (positivt utfall) från andra kemikalier (negativt utfall).

Testkemikalie: alla ämnen eller blandningar som testas med denna testmetod.

Stegvis testningsstrategi: en strategi för stegvis testning där all befintlig information om en testkemikalie granskas i en angiven ordning, med användning av förfarandet med sammanvägd bedömning (weight of evidence) för att avgöra om det finns tillräckligt med information till hands för att besluta om faroklassificering innan man går vidare till nästa steg. Om testkemikaliens förmåga att framkalla irritation kan fastställas på grundval av befintlig information behövs ingen ytterligare testning. Om testkemikaliens förmåga att framkalla irritation inte kan fastställas på grundval av befintlig information genomförs ett stegvis sekventiellt djurförsöksförfarande tills att det går att fastställa en otvetydig klassificering.

GHS (globalt harmoniserat system för klassificering och märkning av kemikalier: ett system för att klassificera ämnen och blandningar enligt standardiserade typer och nivåer av fysiska risker, hälsorisker och miljörisker och informera om resultaten genom t.ex. piktogram, signalord, faroangivelser, skyddsangivelser och säkerhetsdatablad i syfte att informera om ämnenas skadliga effekter för att skydda personer (inklusive arbetsgivare, arbetstagare, transportörer, konsumenter och personal inom räddningstjänsten) och miljön (4).

GHS-kategori 1: se ”Allvarlig ögonskada” och/eller ”irreversibla effekter på ögat”.

GHS-kategori 2: se ”Ögonirritation” och eller ”Reversibla effekter på ögat”.

GHS Ingen kategori: Ämnen som inte uppfyller kraven för att klassificeras som GHS-kategori 1 eller 2 (2A eller 2B). Utbytbart mot ”Ej klassificerad”.

Validerad testmetod: en testmetod för vilken valideringsstudier har genomförts för att fastställa relevans (inbegripet noggrannhet) och tillförlitlighet för ett specifikt ändamål. Det är viktigt att notera att en validerad testmetod kanske inte är tillräckligt noggrann och tillförlitlig när det gäller ett visst föreslaget ändamål.

Sammanvägd bedömning: (weight of evidence) ett förfarande där man bedömer styrkor och svagheter hos flera uppgifter för att nå fram till och motivera en slutsats rörande en kemikalies faropotential.

▼M7

Tillägg 2

KVALIFIKATIONSÄMNEN FÖR ICE-TESTMETODEN

Före rutinanvändning av ett test som följer denna testmetod bör laboratoriet påvisa den tekniska kvaliteten genom att korrekt identifiera klassificeringen av kemikalier som är farliga för ögonen för de 13 kemikalier som rekommenderas i tabell 1. Dessa ämnen har valts ut att representera responsskalan för ämnen som är farliga för ögonen enligt resultaten från in vivo-test på kaninögon (TG 405) och FN:s GHS-klassificieringssystem (dvs. GHS-kategorierna 1, 2A, 2B eller ingen klassificering) (4)(6). Till övriga kriterier hör att ämnena ska vara kommersiellt tillgängliga, att det finns tillgång till in vivo-referensdata av hög kvalitet och att det finns data av hög kvalitet från ICE-testmetoden in vitro. Referensdata finns i SSD (5) och i ICCVAM Background Review Document för ICE-testmetoden (9).

Tabell 1

Rekommenderade kemikalier för att påvisa teknisk kvalitet med ICE-testmetoden

Kemikalie	CASRN	Kemisk klass (1)	Fysikalisk form	In vivo-klassificering (2)	In vitro-klassificering (3)
Bensalkoniumklorid (5 %)	8001-54-5	Oniumförening	Vätska	Kategori 1	Kategori 1
Klorhexidin	55-56-1	Amin, amidin	Fast ämne	Kategori 1	Kategori 1
Dibensoyl-L-tartarsyra	2743-38-6	Karboxylsyra, ester	Fast ämne	Kategori 1	Kategori 1
Imidazol	288-32-4	Heterocyklisk förening	Fast ämne	Kategori 1	Kategori 1
Triklorättiksyra (30 %)	76-03-9	Karboxylsyra	Vätska	Kategori 1	Kategori 1
2,6-Diklorbensoylklorid	4659-45-4	Acylhalid	Vätska	Kategori 2A	Inga förutsägelser kan göras (4)
Ammoniumnitrat	6484-52-2	Oorganiskt salt	Fast ämne	Kategori 2A (5)	Inga förutsägelser kan göras (4)
Etyl-2-metylacetoacetat	609-14-3	Keton, ester	Vätska	Kategori 2B	Inga förutsägelser kan göras (4)
Dimetylsulfoxid	67-68-5	Organisk svavelförening	Vätska	Ingen klassificering	Ingen klassificering
Glycerol	56-81-5	Alkohol	Vätska	Ingen klassificering	Ingen klassificering (gränsfall)
Metylcyklopentan	96-37-7	Kolväte (cykliskt)	Vätska	Ingen klassificering	Ingen klassificering
n-hexan	110-54-3	Kolväte (acykliskt)	Vätska	Ingen klassificering	Ingen klassificering

▼M7

Kemikalie	CASRN	Kemisk klass (1)	Fysikalisk form	In vivo-klassificering (2)	In vitro-klassificering (3)
Triacetin	102-76-1	Fett	Vätska	Inte klassificerad	Ingen klassificering

Förkortningar: CASRN = Chemical Abstracts Service Registry Number

(1) Varje testkemikalie tilldelades en kemisk klass med användning av ett standardsystem baserat på klassificeringssystemet National Library of Medicine Medical Subject Headings (MeSH) (finns på http//www.nlm.nih.gov/mesh).

(2) På grundval av in vivo-test på kaninögon (OECD TG 405) och med användning av GHS (4)(6).

(3) Baserat på resultat i ICE enligt beskrivningen i tabell 6.

(4) Kombination av andra ICE-värden än de som beskrivs i tabell 6 för identifiering av GHS ingen klassificering och GHS-kategori 1 (se tabell 6)

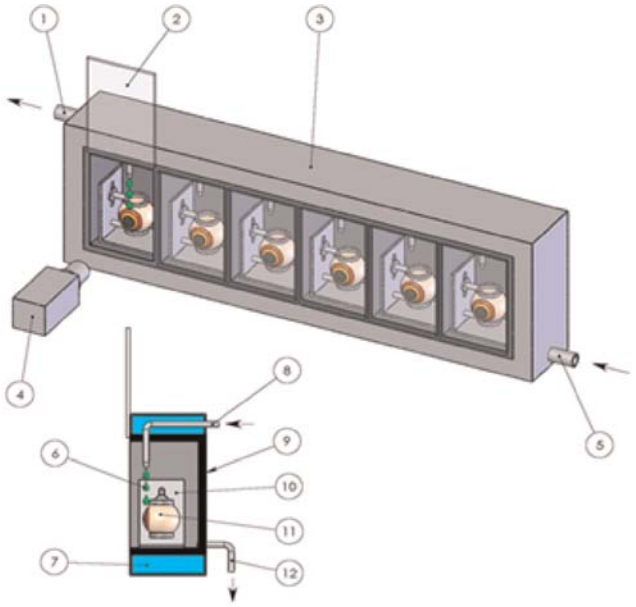
(5) Klassificering i kategori 2B eller 2B beror på tolkningen av GHS-kriteriet för att skilja mellan dessa två kategorier, dvs. 1 av 3 jämfört med 2 av 3 djur med effekter på dag 7, vilket krävs för en klassificering i kategori 2A. In vivo-undersökningen omfattade tre djur. Alla resultatpunkter förutom rodnad konjunktiva hos ett djur återhämtades till noll dag 7 eller tidigare. Det djur som inte hade återhämtat sig fullständigt dag 7 hade en konjunktiv rodnad på 1 (dag 7) som var fullständigt återställd dag 10.

▼M7

Tillägg 3

SUPERFUSIONSAPPARAT OCH ÖGONKLÄMMOR FÖR ICE-TESTMETODEN

(Se Burton m.fl. (18) för ytterligare allmänna beskrivningar av superfusionsapparaten och ögonklämmorna) (18)



CROSS SECTION COMPARTMENT



EYE HOLDER

Post nr	Beskrivning	Post nr	Beskrivning
1	Varmvattenutlopp	9	Fack
2	Skjutdörr	10	Ögonhållare
3	Superfusionsapparat	11	Kycklingöga
4	Optiskt mätinstrument	12	Utgående koksaltlösning
5	Ingående varmvatten	13	Ställskruv
6	Saltlösning	14	Justerbar överarm
7	Varmvatten	15	Fast underarm
8	Ingående koksaltlösning		

▼M7

B.49 MIKROKÄRNTEST AV DÄGGDJURSCELLER IN VITRO

INLEDNING

Denna testmetod motsvarar OECD:s testriktlinje 487 (2016). Den ingår i en serie testmetoder avseende genetisk toxikologi. Ett OECD-dokument som ger kortfattad information om tester inom genetisk toxikologi och en översikt över de senaste ändringarna av dessa testriktlinjer har utarbetats (1).

Mikrokärntest in vitro (MNvit) är ett genotoxicitetstest för att upptäcka mikrokärnor i cytoplasmat i interfasceller. Mikrokärnor kan härröra från acentriska kromosomfragment (dvs. en centromer saknas) eller från hela kromosomer som inte kan migrera till polerna under det anafasa steget av celldelningen. MNvit-testet är en in vitro-metod som ger tillgång till en omfattande bas för undersökning av kromosomskadepotentialen in vitro eftersom både aneugener och klastogener kan upptäckas (2) (3) i celler som har genomgått celldelning under eller efter exponering för testkemikalien (närmare uppgifter ges i punkt 13). Mikrokärnorna representerar skador som har förmedlats till dotterceller, medan kromosomavvikelser som detekteras i metafasceller inte alltid förmedlas. Cellen överlever inte alltid dessa förändringar.

Denna testmetod ger möjlighet att använda protokoll med och utan aktinpolymeriseringsinhibitorn cytokalasin B (cytoB). Tillsättning av cytoB före mitosen gör det möjligt att identifiera och analysera mikrokärnor endast i celler som har slutfört en mitos eftersom sådana celler är binukleära (4) (5). Denna testmetod gör det också möjligt att använda protokoll utan blockering av cytokines, förutsatt att det finns belägg för att den analyserade cellpopulationen har genomgått mitos.

Utöver MNvit-testet för att identifiera kemikalier som inducerar mikrokärnor kan man även använda immunokemisk märkning av kinetokorer eller hybridisering med centromeriska/telomeriska prober (FISH-teknik, Fluorescens In Situ Hybridisation) för att få ytterligare information om mekanismerna för kromosomskador och bildningen av mikrokärnor (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17). Dessa märknings- och hybridiseringsförfaranden kan användas när det förekommer ökad bildning av mikrokärnor och man vill slå fast om ökningen är resultatet av klastogena och/eller aneugena händelser.

Eftersom mikrokärnor i interfasceller kan bedömas relativt objektivt behöver laboratoriepersonalen bara bestämma antalet binukleära celler om cytoB används. Förekomsten av celler med mikrokärnor i ska bestämmas samtliga fall. Detta innebär att utstryksglasen kan klassificeras relativt snabbt och analysen kan automatiseras. Det är därför praktiskt att klassificera tusentals i stället för hundratals celler per behandling, vilket ökar testets styrka. Eftersom mikrokärnor kan uppstå från isolerade kromosomer finns det också möjlighet att detektera aneuploidiframkallande ämnen som är svåra att undersöka genom konventionella kromosomavvikelsetest, t.ex. Kapitel B.10 i denna bilaga (18). MNvit-testet som det beskrivs i denna testmetod ger dock inte möjlighet att utan särskilda tekniker såsom FISH (se punkt 4) skilja mellan kemikalier som inducerar ändringar av kromosomantalet och/eller polyploidi från sådana kemikalier som inducerar klastogenicitet.

MNvit-testet är robust och kan utföras på ett flertal celltyper, med eller utan tillsats av cytoB. Det finns omfattande data som underbygger giltigheten av MNvit testet med användning av olika celltyper (odlingar av cellinjer eller primära cellkulturer) (19) (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28) (29) (30) (31)

▼M7

(32) (33) (34) (35) (36). Dessa data kommer bland annat från internationella valideringsstudier samordnade av *Société Française de Toxicologie Génétique* (SFTG) (19) (20) (21) (22) (23) och rapporter från *International Workshop on Genotoxicity Testing* (5) (17). Tillgängliga data har också omvaliderats i en retrospektiv sammanvägd (weight-of-evidence) valideringsstudie vid Europeiska centret för bestämning av alternativa metoder (ECVAM), och testmetoden har erkänts som vetenskapligt giltig av ECVAM:s vetenskapliga rådgivande kommitté (ESAC) (37) (38) (39).

MNvit-testet på däggdjursceller kan göras med kulturer av cellinjer eller primära cellkulturer från människor eller gnagare. Eftersom bakgrundsfrekvensen av mikrokärnor påverkar testets känslighet, rekommenderas att man använder celltyper med en stabil och definierad bakgrundsfrekvens av mikrokärnbildning. De celler som används bör väljas ut på grundval av god tillväxtförmåga vid odling, karyotypens stabilitet (inklusive antalet kromosomer) och den spontana frekvensen av mikrokärnor (40). De uppgifter som finns tillgängliga för närvarande tillåter inte bestämda rekommendationer, men de tyder på att det i utvärderingen av kemiska faror är viktigt att överväga p53-status, genetisk stabilitet (karyotyp) samt DNA-cellernas återhämtningskapacitet och ursprung (gnagare jämfört med människa) hos de celler som väljs ut för testning. Om denna testmetod används bör man överväga hur dessa och andra cellegenskaper inverkar på en cellinjes förmåga att upptäcka induktionen av mikrokärnor, allteftersom kunskapen utvecklas på detta område.

Definitioner av begreppen finns i tillägg 1.

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN OCH BEGRÄNSNINGAR

För testning in vitro krävs i regel ett exogent system för metabolisk aktivering, om cellerna inte är metaboliskt kompetenta i fråga om de kemikalier som testas. Det exogena metaboliska aktiveringssystemet efterliknar inte helt förhållandena in vivo. Man bör se till att undvika sådana förhållanden som leder till artefaktiska positiva resultat som inte avspeglar testkemikaliernas gentoxicitet. Sådana förhållanden omfattar ändringar av pH (41) (42) (43) eller osmolalitet, interaktion med cellodlingsmediet (44) (45) eller överdrivet höga nivåer av cytotoxicitet (se punkt 29).

För analysen av induktion av mikrokärnor är det av central betydelse att mitos har inträffat i både de behandlade och obehandlade odlingarna. Det mest informativa stadiet för detektering av mikrokärnor är när cellerna har slutfört en mitos under eller efter behandling med testkemikalien. Tillverkade nanomaterial kräver särskilda anpassningar av testmetoden, men de beskrivs inte här.

Innan testmetoden används på en blandning i syfte att samla in data för ett lagstadgat ändamål bör man överväga om, och i så fall varför, den kommer att ge godtagbara resultat för det syftet. Sådana överväganden är inte nödvändiga om blandningen måste provas enligt lag.

TESTPRINCIP

Cellodlingar från människa eller andra däggdjur exponeras för testkemikalien både med och utan ett exogent metaboliskt aktiveringssystem, utom om de celler som används har tillräcklig metaboliserande kapacitet (se punkt 19).

Under eller efter exponering för testkemikalien odlas cellerna tillräckligt länge för att kromosomskador eller andra effekter på cellcykeln/celldelningen ska leda till att mikrokärnor bildas i interfascellerna. För induktion av aneuploidi bör testkemikalien i regel finnas närvarande under mitosen. Interfascellerna skördas och

▼M7

färgas in och närvaron av mikrokärnor analyseras. Idealiskt sett bör man för detekteringen av mikrokärnor endast använda celler som har slutfört mitosen under exponeringen för testkemikalien eller under perioden efter behandlingen, om en sådan används. I odlingar som har behandlats med en cytokinesinhibitor uppnås detta enkelt genom att endast analysera binukleära celler. Om blockering av cytokines inte används är det viktigt att påvisa att de analyserade cellerna sannolikt har genomgått celldelning, baserat på en ökning av cellpopulationen, under eller efter exponeringen för testkemikalien. Oavsett protokoll är det viktigt att påvisa att cellproliferation har skett både i kontrollodlingarna och de behandlade odlingarna, och omfattningen av testkemikalieinducerad cytotoxicitet eller cytostas ska bedömas i alla odlingar som är föremål för analys av mikrokärnor.

BESKRIVNING AV TESTMETODEN

Celler

Man kan använda odlade primära perifera blodlymfocyter från människa eller andra däggdjur (7) (20) (46) (47) och celler från ett antal gnagarcellinjer såsom CHO, V79, CHL/IU och L5178Y (19) (20) eller humana cellinjer såsom TK6 (19) (20) (21) (22) (23) (26) (27) (28) (29) (31) (33) (34) (35) (36) (se punkt 6). Andra cellinjer, såsom HT29 (48), Caco-2 (49), HepaRG (50) (51), HepG2-celler (52) (53), A549 och primära embryoceller från syrisk hamster (54) har använts för testning av mikrokärnor, men har inte genomgått en omfattande validering ännu. Användning av dessa cellinjer och celltyper bör därför motiveras på grundval av deras påvisade prestanda i testet enligt beskrivningen i avsnittet om kriterier för godkännande. Cyto B rapporterades potentiellt påverka celltillväxten för L5178Y och rekommenderas inte för denna cellinje (23). Om primära celler används av djurskyddsskäl bör man när så är möjligt överväga användning av celler med mänskligt ursprung som samlas in enligt humana etiska principer och regler.

Humana perifera blodlymfocyter bör tas från unga rökfria personer (cirka 18–35 år) utan kända sjukdomar som inte nyligen har exponerats för genotoxiska agens (t.ex. kemikalier, joniserande strålning) vid nivåer som skulle öka den bakomliggande incidensen av celler med mikrokärnor. Detta garanterar att den bakomliggande incidensen av celler med mikrokärnor är låg och konstant. Förekomsten av celler med mikrokärnor ökar med åldern och denna tendens är mer markerad hos kvinnor än hos män (55). Om celler från fler än en givare poolas för användning bör antalet givare anges. Man måste kunna påvisa att cellerna har delat sig från det att behandlingen med testkemikalien påbörjades fram till provtagningen av cellerna. Cellodlingarna hålls i en exponentiell tillväxtfas (cellinjer) eller stimuleras så att de delar sig (primära lymfocytodlingar). Syftet med detta är att exponera cellerna i olika stadier av cellcykeln eftersom cellstadiernas sensitivitet för testkemikalierna kanske inte är känd. De primära celler som måste stimuleras med mitogena agens för att dela sig är i regel inte längre synkroniserade under exponeringen för testkemikalien (t.ex. humana lymfocyter efter mitogenisk stimulans i 48 timmar). Användning av synkroniserade celler under behandling med testkemikalien rekommenderas inte, men kan vara godtagbar om det är motiverat.

Medier och odlingsbetingelser

Lämpliga odlingsmedier och inkubationsförhållanden (odlingskärl, luftfuktighet på 5 % CO_2 i förekommande fall, en temperatur på 37 °C) bör väljas för odlingarna. Cellinjer bör rutinmässigt kontrolleras med avseende på det modala kromosomantalets stabilitet och frånvaro av kontaminerad mykoplasma, och cellerna får inte användas om kontamination har skett eller om det modala kromosomantalet har ändrats. Cellernas normala cellcykeltid eller den normala cellcykeltiden hos de primära kulturer som används i testlaboratoriet bör fastställas och bör överensstämma med kända cellegenskaper.

▼M7

Beredning av odlingarna

Cellinjer: celler dras upp från stamkulturer, sås ut i ett odlingsmedium som har en sådan densitet att celler i suspension eller monolager fortsätter att växa exponentiellt fram till skörd (konfluens av celler som växer i monolager bör undvikas).

Lymfocyter: helblod, behandlat med en antikoagulant (t.ex. heparin), eller separerade lymfocyter odlas (t.ex. 48 timmar för humana lymfocyter) i närvaro av ett mitogen (t.ex. fytohemaglutinin [PHA] för humana lymfocyter) för att framkalla celldelning innan cellerna exponeras för testkemikalien och cytoB.

Metabolisk aktivering

Exogena metaboliserande system bör användas när cellerna inte har tillräcklig endogen metabolisk kapacitet. Det mest använda systemet, som rekommenderas som standard om inte annat kan motiveras, är en kofaktorstödd post-mitokondriell fraktion (S9) beredd ur lever från gnagare (vanligen råttor) som behandlats med enzyminducerande ämnen såsom Aroclor 1254 (56) (57) eller en kombination av fenobarbital och b-naftoflavon (58) (59) (60). Den senare kombinationen bryter inte mot Stockholmskonventionen om långlivade organiska föroreningar (61) och har visat sig vara lika effektiv som Aroclor 1254 när det gäller att inducera monooxygenaser (”mixed-function oxidases”) (58) (59) (60). S9-fraktionen används vanligen i koncentrationer mellan 1–2 volymprocent men kan ökas till 10 volymprocent i det slutliga testmediet. Användning av produkter som minskar det mitotiska indexet, särskilt kalciumkomplexprodukter (62), bör undvikas under behandlingen. Valet av typ och koncentration av använt exogent metaboliskt aktiveringssystem eller metabolisk induktion kan påverkas av den kemikalieklass som testas.

Beredning av testkemikalien

Fasta testkemikalier bör beredas med lämpliga lösningsmedel och vid behov spädas ut innan cellerna behandlas. Flytande testkemikalier kan tillsättas direkt till testsystemet och/eller spädas ut före behandling av testsystemet. Gaser eller flyktiga testkemikalier bör testas genom lämpliga modifikationer av standardprotokollen, såsom behandling i slutna kärl (63) (64) (65). Testkemikalien bör beredas strax innan behandling om inte stabilitetsdata visar att lagringen är acceptabel.

Testbetingelser

Lösningsmedel

Man bör välja ett lösningsmedel som optimerar testkemikaliens löslighet utan att testet påverkas negativt, t.ex. genom förändringar i celltillväxten som påverkar testkemikaliens integritet, reaktion med odlingskärlen eller försämrad metabolisk aktivering. När det är möjligt, rekommenderas att man i första hand överväger vattenbaserade lösningsmedel (eller odlingsmedier). Vedertagna lösningsmedel är vatten eller dimetylsulfoxid (DMSO). Organiska lösningsmedel bör i regel inte överstiga 1 volymprocent. Om cytoB löses upp i DMSO får den totala mängden organiskt lösningsmedel som används för både testkemikalien och cytoB inte överstiga 1 volymprocent. I annat fall bör obehandlade kontroller användas för att se till att procentandelen organiskt lösningsmedel inte ger en negativ effekt. Vattenhaltiga lösningsmedel (saltlösningar eller vatten) bör inte överstiga 10 volymprocent i det slutliga behandlingsmediet. Om man använder lösningsmedel

▼M7

som inte är vedertagna (t.ex. etanol eller aceton) bör detta stödjas av uppgifter om att de är förenliga med testkemikalierna och testsystemet och att de inte är genetiskt toxiska vid den använda koncentrationen. Om ett sådant underlag saknas är det viktigt att inkludera obehandlade kontroller (se tillägg 1) och lösningsmedelskontroller som påvisar att inga skadliga effekter eller kromosomeffekter (t.ex. aneuplodi eller klastogenitet) induceras av det valda lösningsmedlet.

Användning av cytoB som cytokinesinhibitor

En av de viktigaste faktorerna när det gäller MNvit-testets resultat är att se till att de celler som analyseras har slutfört mitosen under behandlingen eller under eventuell inkubationsperiod efter behandlingen. Analysen av mikrokärnor bör då begränsas till celler som har genomgått mitos under eller efter behandlingen. CytoB är det ämne som oftast används för blockering av cytokines eftersom det hindrar aktinbildning och således hindrar separationen av dotterceller efter mitosen så att binukleära celler kan bildas (6) (66) (67). Samtidigt kan man mäta testkemikaliens effekt på cellproliferationskinetiken när cytoB används. CytoB ska användas som cytokinesinhibitor när humana lymfocyter används eftersom cellcykeltiderna varierar mellan givare och eftersom inte alla lymfocyter ger respons på PHA-stimulans. CytoB är inte obligatoriskt för andra celltyper om det kan fastställas att de har genomgått uppdelning enligt beskrivningen i punkt 27. CytoB används normalt inte när proverna utvärderas med avseende på mikrokärnor med användning av flödescytometriska metoder.

Laboratoriet bör fastställa lämplig koncentration av cytoB för varje celltyp i syfte att nå optimal förekomst av binukleära celler i kontrollodlingarna för lösningsmedel/vehikel och bör visa att det kan producera en tillräcklig mängd binukleära kärnor för klassificering. Lämplig cytoB-koncentration är i regel 3–6 μg/ml (19).

Mätning av cellproliferation och cytotoxicitet och val av exponeringskoncentrationer

Vid bestämning av den högsta testkemikaliekoncentrationen ska man undvika koncentrationer som kan ge artefaktiska positiva resultat, t.ex. för kraftig cytotoxicitet (se punkt 29), utfällning i odlingsmediet (se punkt 30) och markerade ändringar av pH eller osmolalitet (se punkt 9). Om testkemikalien orsakar en markerad ändring av pH i mediet vid tillsättningstidpunkten kan pH justeras, företrädesvis genom buffring av det slutliga behandlingsmedlet för att undvika artefaktiska positiva resultat och upprätthålla lämpliga odlingsförhållanden.

Cellproliferationen bör mätas för att se till att tillräckligt många behandlade celler har genomgått mitos under testet och att behandlingarna görs på lämpliga nivåer av cytotoxicitet (se punkt 29). Cytotoxicitet bör fastställas med och utan metabolisk aktivering i huvudförsöket med hjälp av lämplig indikation på celldöd och tillväxt (se punkterna 26 och 27). Även om det kan vara användbart att utvärdera cytotoxicitet i ett preliminärt test för att bättre definiera de koncentrationer som ska användas i huvudförsöket är ett preliminärt test inte obligatoriskt. Om ett preliminärt test utförs bör det inte ersätta mätning av cytotoxicitet i huvudförsöket.

Behandling av odlingarna med cytoB och mätning av de relativa frekvenserna av mononukleära, binukleära och multinukleära celler i odlingen är en noggrann metod för kvantifiering av effekten på cellproliferationen och behandlingens cytotoxiska eller cytostatiska aktivitet (6) och säkerställer att endast celler som

▼M7

har delat sig under eller efter behandlingen analyseras mikroskopiskt. CBPI (Cytokinesis-Block Proliferation Index) (6) (27) (68) eller replikeringsindex (RI) från minst 500 celler per odling (se tillägg 2 för formler) rekommenderas för att uppskatta behandlingens cytotoxiska eller cytostatiska aktivitet genom en jämförelse av värdena i de behandlade odlingarna och kontrollodlingarna. Bedömning av andra indikatorer på cytotoxicitet (t.ex. cellernas integritet, apoptos, nekros, antalet metafaser, men bör inte användas i stället för CBPI eller RI.

I studier utan cytoB är det nödvändigt att påvisa att cellerna i odlingen har genomgått delning, så att en avsevärd andel av de klassificerade cellerna har genomgått delning under eller efter behandling med testkemikalien. Annars kan man få falsk negativ respons. Mätning av relativ populationsfördubbling (RPD) eller relativ ökning av celltal (RICC) rekommenderas för att uppskatta den cytotoxiska eller cytostatiska aktiviteten i behandlingen (17) (68) (69) (70) (71) (se tillägg 2 för formler). Vid förlängda provningstider (t.ex. behandling för 1,5–2 gånger den normala cellcykelns längd och skörd efter ytterligare 1,5–2 gånger den normala cellcykelns längd som leder till provtagningstider som är längre än totalt 3–4 normala cellcykellängder enligt beskrivningen i punkterna 38 och 39) kan cytotoxiciteten underskattas med RPD (71). Under dessa omständigheter kan RICC vara ett bättre mått. Det kan också vara användbart att utvärdera utvecklingen av cytotoxicitet efter 1,5–2 gånger den normala cellcykelns längd. Bedömning av andra markörer för cytotoxicitet eller cytostas (t.ex. cellintegritet, apoptos, nekros, antalet metafaser, proliferationsindex (PI), cellcykel, nukleoplasmabryggor eller nukleära knoppar kan ge värdefull information, men bör inte användas i stället för RPD eller RICC.

Minst tre testkoncentrationer (exklusive lösningsmedel och positiva kontroller) som uppfyller acceptanskriterierna (lämplig cytotoxicitet, antal celler osv.) bör utvärderas. Oavsett celltyp (cellinjer eller primära odlingar av lymfocyter) kan antingen replikat eller så kan enstaka behandlade kulturer användas för varje testad koncentration. Två odlingar rekommenderas, men enstaka odlingar är också godtagbara under förutsättning att samma totala antal celler registreras för antingen enstaka eller dubbla kulturer. Användningen av en enstaka odling är särskilt relevant när fler än tre koncentrationer bedöms (se punkterna 44–45). De resultat som erhölls i de oberoende replikatodlingarna vid en given koncentration kan slås ihop för dataanalysen. För testkemikalier med låg eller ingen cytotoxicitet är två- till trefaldiga koncentrationsintervaller vanligen lämpliga. Där cytotoxicitet uppträder bör de valda testkoncentrationerna omfatta intervallet från att producera cytotoxicitet som beskrivs i punkt 29 och inkludera koncentrationer vid vilka det är måttlig och liten eller ingen cytotoxicitet. Många testkemikalier uppvisar koncentrationsreponskurvor. För att få uppgifter vid låg och måttlig cytotoxicitet eller undersöka dos-responsförhållandet i detalj är det därför nödvändigt att använda mer nära varandra liggande koncentrationer och/eller fler än tre koncentrationer (enstaka kulturer eller replikat) i situationer där försöket måste upprepas (se punkt 60).

Om den maximala koncentrationen baseras på cytotoxicitet bör den högsta koncentrationen syfta till att uppnå 55 ± 5 % cytotoxicitet med hjälp av de rekommenderade cytotoxicitetparametrarna (dvs. minskning av RICC och RPD för cellinjer när cytoB inte används och minskning av CBPI eller RI när cytoB används till 45 ± 5 % av den parallella negativa kontrollen) (72). Man bör vara försiktig i tolkningen av positiva resultat som endast återfinns i den övre delen av detta cytotoxicitetsintervall på 55 ± 5 % (71).

▼M7

För svårlösliga testkemikalier som inte är cytotoxiska vid koncentrationer som är lägre än den lägsta olösliga koncentrationen bör den högsta analyserade koncentrationen framkalla grumlighet eller en fällning som är synlig med blotta ögat eller med hjälp av ett inverterat mikroskop vid slutet av behandlingen med testkemikalien. Även om cytotoxicitet förekommer över den lägsta olösliga koncentrationen är det lämpligt att testa endast en koncentration som inducerar grumlighet eller har en synlig fällning, eftersom fällningen kan ge artefaktiska effekter. När det gäller koncentrationer som ger fällningar bör man se till att detta inte stör testet (t.ex. färgning eller bestämning). Bestämning av löslighet i odlingsmediet före försöket kan vara användbart.

Om ingen cytotoxicitet eller utfällning observeras ska de högsta testkoncentrationerna motsvara 10 mM, 2 mg/ml eller 2 µl/ml, enligt det som är lägst (73) (74) (75). Om testkemikalien inte har en definierad sammansättning, t.ex. ett ämne med okänd eller variabel sammansättning, komplexa reaktionsprodukter eller biologiskt material (UVCB) (76), miljöextrakt osv., kan man behöva använda en högre toppkoncentration (t.ex. 5 mg/ml) om inte cytotoxiciteten är tillräckligt hög så att koncentrationen för varje komponent ökas. Det bör dock noteras att dessa krav kan skilja sig för humanläkemedel (93).

Kontroller

Parallella negativa kontroller (se punkt 21), bestående av lösningsmedel eller enbart en vehikel i behandlingsmediet, och hanterade på samma sätt som behandlingsodlingarna, bör inkluderas var gång som odlingen skördas.

Parallella positiva kontroller behövs för att visa laboratoriets förmåga att identifiera klastogener och aneugener enligt villkoren i det använda testprotokollet och, i förekommande fall, effektiviteten hos det exogena systemet för metabolisk aktivering. Exempel på positiva kontroller ges i tabell 1 nedan. Alternativa positiva kontrollkemikalier kan användas om det är motiverat.

För närvarande känner man inte till några aneugener som kräver metabolisk aktivering för sin genotoxiska aktivitet (17). Tester in vitro av däggdjursceller med avseende på genetisk toxicitet är tillräckligt standardiserade för de kortvariga behandlingar som görs parallellt med och utan metabolisk aktivering med samma behandlingslängd. Användningen av positiva kontroller kan därför begränsas till en klastogen som kräver metabolisk aktivering. I detta fall visar en enda klastogen positiv kontrollrespons både aktiviteten hos det metaboliska aktiveringssystemet och testsystemets responsivitet. Separata positiva kontroller bör dock göras av långvariga behandlingar (utan S9) eftersom behandlingstiden skiljer sig från tester med metabolisk aktivering. Om en klastogen används som den enda positiva kontrollen för en kortvarig behandling med eller utan metabolisk aktivering bör en aneugen väljas för den långvariga behandlingen utan metabolisk aktivering. Positiva kontroller för både klastogenicitet och aneugenicitet bör användas för metaboliskt kompetenta celler som inte kräver S9.

Varje positiv kontroll bör användas för en eller flera koncentrationer som förväntas ge ökningar över bakgrunden som går att reproducera och detektera. Syftet med detta är att visa testsystemets sensitivitet (dvs. verkningarna är tydliga men avslöjar inte omedelbart identiteten hos de kodade utstryksglasen för avläsaren), och responsen får inte äventyras av cytotoxicitet som överskrider de gränser som anges i testmetoden.

▼M7

Tabell 1

Rekommenderade referenskemikalier för utvärdering av laboratoriets kompetens att välja positiva kontroller.

Kategori	Kemikalie	CASRN
1. **Klastogener utan metabolisk aktivering**		
	Metylmetansulfonat	66-27-3
	Mitomycin C	50-07-7
	4-nitrokinolin-N-oxid	56-57-5
	Cytosinarabinosid	147-94-4
2. **Klastogener som kräver metabolisk aktivering**		
	Benso(a)pyren	50-32-8
	Cyklofosfamid	50-18-0
3. **Aneugener**		
	Colchicin	64-86-8
	Vinblastin	143-67-9

FÖRFARANDE

Behandlingsschema

För att maximera sannolikheten för att detektera en aneugen eller klastogen som agerar i ett visst skede av cellcykeln är det viktigt att ett tillräckligt antal celler som representerar alla de olika skedena i cellcykeln behandlas med testkemikalien. Alla behandlingar bör inledas och avslutas medan cellerna växer exponentiellt och cellerna bör fortsätta att växa fram till provtagningen. Behandlingsscheman för cellinjer och primära cellodlingar kan därför avvika något från behandlingsschemat för lymfocyter som kräver mitogen stimulering för att inleda sin cellcykel (17). För lymfocyter är det effektivast att inleda behandlingen med testkemikalien 44–48 timmar efter PHA-stimulering, när cellerna delar sig på ett asynkront sätt (6).

Offentliggjorda data (19) tyder på att de flesta aneugener och klastogener detekteras med en kortvarig behandlingsperiod på 3–6 timmar med och utan tillsats av S9, åtföljd av borttagning av testkemikalien och provtagning vid en tidpunkt som motsvarar ungefär 1,5–2,0 gånger den normala cellcykelns längd efter inledandet av behandlingen (7).

För en grundlig utvärdering, vilket krävs för en slutsats om ett negativt resultat, bör dock samtliga tre försöksförhållanden som anges nedan tillämpas i en korttidsbehandling med och utan metabolisk aktivering samt en långtidsbehandling utan metabolisk aktivering (se punkterna 56, 57 och 58):

— Cellerna bör exponeras för testkemikalien utan metabolisk aktivering, under 3–6 timmar och prov bör tas ut vid en tid som motsvarar cirka 1,5–2,0 gånger den normala cellcykelns längd efter det att behandlingen har påbörjats (19).

— Celler bör exponeras för testkemikalien med metabolisk aktivering i 3-6 timmar, och provtas vid en tidpunkt som motsvarar cirka 1,5–2,0 gånger den normala cellcykelns längd efter behandlingens början (19),

▼M7

— Cellerna bör exponeras kontinuerligt utan metabolisk aktivering tills provtagning under en tidsperiod som motsvarar cirka 1,5–2,0 gånger de normala cellcykellängderna.

Om något av de ovannämnda försöksförhållandena leder till en positiv respons kan andra behandlingssystem behöva övervägas.

Om det är känt eller man misstänker att testkemikalien påverkar cellcykellängden (t.ex. vid testning av nukleosidanaloger), särskilt för p53-kompetenta celler (35) (36) (77), kan provtagnings- eller återhämtningstiderna förlängas med upp till ytterligare 1,5–2,0 gånger den normala cellcykelns längd (dvs. totalt 3,0–4,0 gånger den normala cellcykelns längd efter inledandet av kort- och långvariga behandlingar). Dessa alternativ gäller för situationer där det kan finnas tvivel rörande eventuell växelverkan mellan testkemikalien och cytoB. Om förlängda provtagningstider används (dvs. totalt 3,0–4,0 gånger den normala cellcykelns längd) är det viktigt att säkerställa att cellerna fortfarande aktivt delar på sig. Lymfocyters exponentiella tillväxt kan t.ex. minska vid 96 timmar efter stimulering och celler som växer i monolager kan bli konfluenta.

Förslag till cellbehandlingsscheman sammanfattas i tabell 2. Dessa allmänna behandlingsscheman kan modifieras (och bör motiveras) beroende på testkemikaliens stabilitet eller reaktivitet eller de särskilda tillväxtegenskaper som gäller för de celler som används.

Tabell 2

Tidpunkter för cellbehandling och skörd när MNvit-testet används

Lymfocyter, primära celler och cellinjer behandlade med cytoB	+ S9 Kort behandling	Behandla 3–6 timmar med tillsats av S9, avlägsna S9 och behandlingsmedium, tillsätt färskt medium och cytoB, skörda efter 1,5–2,0 normala cellcykler efter inledandet av behandlingen.
	– S9 Kort behandling	Behandla 3–6 timmar, avlägsna behandlingsmedium, tillsätt färskt medium och cytoB, skörda efter 1,5–2,0 normala cellcykler efter inledandet av behandlingen.
	– S9 Utvidgad behandling	Behandla under 1,5–2 normala cellcykellängder med tillsats av cytoB, skörda i slutet av behandlingsperioden.
Cellinjer som behandlas utan cytoB (samma som de behandlingsscheman som anges ovan utom att cytoB inte tillsätts)		

I monolagerodlingar kan det finnas mitotiska celler (som identifieras genom att de är runda och lösgör sig från ytan) i slutet av behandlingen på 3–6 timmar. Eftersom dessa mitotiska celler enkelt lösgörs, kan de förloras när mediet som innehåller testkemikalien avlägsnas. Om det finns bevis för en betydande ökning av antalet mitotiska celler jämfört med kontrollerna, vilket tyder på en sannolik mitotisk hämning, bör cellerna samlas in genom centrifugering och tillsättas till odlingarna igen, så att man undviker risken att förlora celler i mitos och risken för mikrokärn-/kromosomavvikelser vid skördetidpunkten.

▼M7

Skörd av celler och beredning av utstryksglas

Varje odling bör skördas och hanteras separat. Cellerna kan förberedas med hypoton behandling, men detta steg är inte nödvändigt om lämplig cellspridning kan åstadkommas på annat sätt. Olika tekniker kan användas för beredningen av utstryksglasen, förutsatt att cellberedningar av hög kvalitet för klassificeringen erhålls. Celler med intakta cellmembran och cytoplasma bör behållas för att ge möjlighet att detektera mikrokärnor och (vid metoden med blockering av cytokines) tillförlitlig identifiering av binukleära celler.

Utstryksglasen kan färgas med olika metoder, såsom Giemsa eller fluorescerande DNA-specifika färgämnen. Användningen av lämplig fluoresceinfärgning (t.ex. akridinorange (78) eller Hoechst 33258 plus pyronin-Y (79)) kan eliminera några av de artefakter som ar associerade med användning av ett färgämne som inte är DNA-specifikt. Anti-kinetokor-antikroppar, FISH-teknik med pancentromera DNA-prober eller primad in situ-märkning med pancentromerspecifik primer, tillsammans med lämplig DNA-motfärgning kan användas för att identifiera innehållet (hela kromosomer färgas medan acentriska kromosomfragment inte färgas) av mikrokärnor om man är intresserad av mekanismer för hur de bildas (16) (17). Andra metoder för differentiering mellan klastogener och aneugener kan användas om de har visat sig vara effektiva och är validerade. För vissa cellinjer kan t.ex. mätningar av kärnor av typen sub-2N som hypodiploida händelser med hjälp av tekniker som bildanalys, laserskanningcytometri eller flödescytometri också ge användbar information (80) (81) (82). Morfologiska observationer av kärnor kan också ge indikationer på eventuell aneuploidi. Ett test avseende metafas-kromosomavvikelser, företrädesvis av samma celltyp och protokoll med jämförbar sensitivitet, kan också vara ett användbart sätt att avgöra om mikrokärnorna beror på kromosombrott (med vetskap om att kromosomförlust inte upptäcks i testet avseende kromosomavvikelser).

Analys

Alla utstryksglas, inklusive glasen från lösningsmedelskontrollerna och de obehandlade kontrollerna (om sådana används) samt de positiva kontrollerna, bör ges en oberoende kodning före mikroskopanalysen av mikrokärnornas frekvenser. Om ett automatiskt klassificeringssystem används bör lämpliga tekniker tillämpas för att kontrollera eventuella avvikelser eller drift, t.ex. flödescytometri, laserskanningcytometri eller bildanalys. Oavsett om en automatisk plattform används för att räkna mikrokärnorna, bör CBPI, RI, RPD eller RICC bedömas samtidigt.

I cytoB-behandlade odlingar bör mikrokärnornas frekvenser analyseras i minst 2 000 binukleära celler per koncentration och kontroll (83), lika fördelade mellan replikaten om sådana används. När det gäller enstaka odlingar per dos (se punkt 28) bör åtminstone 2 000 binukleära celler per odling (83) klassificeras i den enstaka odlingen. Om betydligt mindre antal än 1 000 binukleära celler per odling (för dubbla odlingar), eller 2 000 (för enstaka odlingar) finns att tillgå för analys för varje koncentration och en väsentlig ökning av mikrokärnor inte upptäcks, bör testet upprepas med användning av flera celler eller vid mindre cytotoxiska koncentrationer, enligt det som är lämpligt. Man bör vara noga med att inte klassificera binukleära celler med oregelbundna former eller om de två kärnorna skiljer sig betydligt i storlek. Dessutom får binukleära celler inte sammanblandas med dåligt spridda flerkärniga celler. Celler som innehåller fler än två huvudkärnor bör inte analyseras för mikrokärnor, eftersom grundvärdet för

▼M7

mikrokärnornas frekvenser kan vara högre i dessa celler (84). Klassificering av enkärniga celler är godtagbart om testkemikalien har visat sig störa cytoB-aktiviteten. I sådana fall kan ett upprepat test utan cytoB vara användbart. Klassificering av enkärniga celler förutom binukleära celler kan ge användbar information (85) (86), men är inte obligatoriskt.

I cellinjer som testas utan cytoB-behandling bör mikrokärnorna klassificeras i minst 2 000 celler per testkoncentration och kontroll (83), lika fördelade mellan replikaten om sådana används. Om enstaka odlingar används per koncentration (se punkt28) bör minst 2 000 celler per odling klassificeras i den enstaka odlingen. Om betydligt mindre antal än 1 000 celler per odling (för dubbla odlingar), eller 2 000 (för enstaka odlingar) finns att tillgå för analys för varje koncentration och en väsentlig ökning av mikrokärnor inte upptäcks, bör testet upprepas med användning av flera celler eller vid mindre cytotoxiska koncentrationer, enligt det som är lämpligt.

När cytoB används bör proliferationsindex vid cytokinesinhibering (CBPI) eller replikeringsindex (RI) bestämmas för bedömning av cellproliferationen (se tillägg 2) med användning av minst 500 celler per odling. När behandlingar görs utan tillsats av cytoB är det väsentligt att belägg ges för att cellerna i odlingen har delats, enligt beskrivningen punkterna 24–28.

Laboratoriets kompetens

För att fastställa att det finns tillräcklig erfarenhet av testet innan det används för rutintestning bör laboratoriet ha utfört en serie försök med positiva referenskemikalier som agerar via olika mekanismer (åtminstone ett med och ett utan metabolisk aktivering och ett som agerar via en aneugenisk mekanism, valt från kemikalierna i tabell 1) och flera negativa kontroller (inklusive obehandlade odlingar och olika lösningsmedel/vehiklar). Dessa positiva och negativa kontrollresponser bör överensstämma med litteraturen. Detta gäller inte laboratorier som redan har erfarenhet, dvs. har en historisk databas enligt punkterna 49–52.

Laboratoriet bör undersöka ett urval av positiva kontrollkemikalier (se tabell 1) med korta och långa behandlingar utan metabolisk aktivering, och även med kort behandlingstid med metabolisk aktivering, för att visa att det har kompetens att upptäcka klastogena och aneugena kemikalier, bestämma effektiviteten hos det metaboliska aktiveringssystemet och visa att klassificeringsförfarandena är lämpliga (visuell mikroskopanalys, flödescytometri, laserskanningcytometri eller bildanalys). En rad koncentrationer av de valda kemikalierna bör användas för att ge reproducerbara och koncentrationsrelaterade ökningar över bakgrunden i syfte att visa testsystemets sensitivitet och dynamiska omfång.

Historiska kontrolldata

Laboratoriet bör fastställa följande:

— Historiskt positivt kontrollintervall samt fördelning.

— Historiskt negativt (obehandlad, lösningsmedel) kontrollintervall samt fördelning.

Om data för en historisk negativ kontrollfördelning samlas in först bör de parallella negativa kontrollerna överensstämma med publicerade data för negativa kontroller om sådana finns. Allteftersom kontrollfördelningen kompletteras med fler försöksdata bör de parallella negativa kontrollerna i idealfallet ligga inom fördelningens kontrollgräns på 95 % (87) (88). Laboratoriets historiska negativa kontrolldatabas kontroll bör inledningsvis baseras på minst 10 försök, men bör helst bestå av minst 20 försök utförda under jämförbara försöksbetingelser. Laboratorierna bör använda kvalitetskontrollmetoder såsom kontrolldiagram (t.ex. C-diagram eller X-stapeldiagram (88)), för att fastställa hur variabla deras

▼M7

positiva och negativa kontrolldata är och för att visa att metoden är ”under kontroll” (83). Fler rekommendationer om hur man bygger upp och använder historiska kontrolldatabaser (t.ex. kriterier för att innefatta och utesluta data samt acceptanskriterier för ett givet försök) finns i litteraturen (87).

Eventuella ändringar av försöksprotokollen bör övervägas när det gäller uppgifternas överensstämmelse med laboratoriets befintliga historiska kontrolldatabaser. Alla större inkonsekvenser bör leda till att en ny historisk kontrolldatabas upprättas.

Negativa kontrolldata bör bestå av förekomsten av celler med mikrokärnor från en enda odling eller summan av replikatodlingar enligt beskrivningen i punkt 28. Parallella negativa kontroller bör helst ligga inom kontrollgränsen på 95 % för fördelningen av laboratoriets historiska negativa kontrolldatabas (87) (88). Om parallella negativa kontrolldata faller utanför kontrollgränserna på 95 % kan de ändå ingå i den historiska kontrollfördelningen så länge de inte är extremt avvikande och det finns bevis för att testsystemet är under kontroll (se punkt 50) och att inga tekniska eller mänskliga fel begåtts.

DATA OCH RAPPORTERING

Presentation av resultaten

Om blockering av cytokines används ska endast förekomsten av binukleära celler med mikrokärnor (oavsett antalet mikrokärnor per cell) användas för utvärderingen av inducering av mikrokärnor. Analysen av antalet celler med en, två eller flera mikrokärnor kan rapporteras separat och kan ge användbar information, men är inte obligatorisk.

Parallella mått på cytotoxicitet och/eller cytostas för alla behandlade odlingar och negativa och positiva kontrollodlingar bör bestämmas (16). Proliferationsindex vid cytokinesinhibering (CBPI) eller replikeringsindex (RI) bör beräknas för alla behandlade odlingar och kontrollodlingar som mått på cellcykelfördröjning när blockering av cytokines används. Om cytoB inte tillsätts bör relativ populationsfördubbling (RPD) eller relativ ökning av celltal (RICC) användas (se tillägg 2).

Data bör anges per enskild odling. Dessutom bör alla data sammanfattas i tabellform.

Kriterier för godkännande

Testet måste uppfylla följande kriterier för att godkännas:

— Den parallella negativa kontrollen måste anses godtagbar för registrering i laboratoriet historiska databas över negativa kontroller enligt punkt 50.

— Parallella positiva kontroller (se punkt 50) bör framkalla reaktioner som överensstämmer med de kontroller som genereras i laboratoriets historiska databas över positiva kontroller och ge en statistiskt signifikant ökning jämfört med den parallella negativa kontrollen.

— Cellproliferationskriterierna i lösningsmedelskontrollen bör vara uppfyllda (punkterna 25–27).

— Samtliga försöksbetingelser testades om inte ett gav positiva resultat (punkterna 36–40).

— Tillräckligt många celler och koncentrationer finns tillgängliga för analys (punkterna 28 och 44–46).

▼M7

— Urvalskriterierna för toppkoncentrationen överensstämmer med de kriterier som beskrivs i punkterna 24–

Utvärdering och tolkning av resultaten

Under förutsättning att samtliga acceptanskriterier är uppfyllda anses testkemikalien vara klart positiv om något av följande gäller för någon av de undersökta försöksbetingelserna (se punkterna 36–39):

— Åtminstone en av testkoncentrationerna uppvisar en statistiskt signifikant ökning jämfört med den parallella negativa kontrollen (89).

— Ökningen är dosrelaterad i åtminstone en försöksbetingelse vid utvärdering med ett lämpligt trendtest (se punkt 28).

— Något av resultaten ligger utanför fördelningen av historiska negativa kontrolldata (t.ex. Poisson-baserade 95 %-kontrollgränser, se punkt 52).

Om alla dessa kriterier är uppfyllda anses testkemikalien kunna inducera kromosombrott och/eller vinst eller förlust hos odlade däggdjursceller i detta testsystem. Rekommendationer om de lämpligaste statistiska metoderna finns även i litteraturen (90) (91) (92).

Under förutsättning att samtliga acceptanskriterier är uppfyllda anses testkemikalien vara klart negativ om följande gäller för samtliga undersökta försöksbetingelser (se punkterna 36–39):

— Ingen av testkoncentrationerna uppvisar en statistiskt signifikant ökning jämfört med den parallella negativa kontrollen.

— Det finns ingen koncentrationsrelaterad ökning vid utvärdering med ett lämpligt trendtest.

— Alla resultat ligger inom fördelningen av historiska negativa kontrolldata (t.ex. Poisson-baserade 95 %-kontrollgränser, se punkt 52).

Testkemikalien anses inte kunna inducera kromosombrott och/eller vinst eller förlust hos odlade däggdjursceller i detta testsystem. Rekommendationer om de lämpligaste statistiska metoderna finns även i litteraturen (90) (91) (92).

Det finns inget krav på verifiering av ett tydligt positivt eller negativt svar.

Om responsen varken är klart negativ eller klart positiv enligt beskrivningen ovan och/eller för att göra det lättare att fastställa resultatets biologiska relevans bör uppgifterna fackgranskas och/eller undersökas ytterligare. Det kan även vara användbart att klassificera ytterligare celler (i förekommande fall) eller upprepa försöket, eventuellt med ändrade försöksbetingelser (t.ex. koncentrationsavstånd, andra metaboliska aktiveringsbetingelser [dvs. S9 koncentration eller S9-ursprung]) kan vara användbart.

I sällsynta fall är det, trots ytterligare undersökningar, inte möjligt att dra en slutsats om huruvida testkemikalien ger positiva eller negativa resultat och i dessa fall anses undersökningen vara tvetydig.

Att testkemikalier inducerar mikrokärnor i MNvit-testet kan bero på att de inducerar kromosombrott, kromosomförlust eller en kombination av dessa två. Ytterligare analys med användning av anti-kinetokor-antikroppar, centromerspecifika in situ-prober eller andra metoder kan göras för att avgöra huruvida mekanismen för inducering av mikrokärnor beror på klastogen och/eller aneugen aktivitet.

▼M7

Testrapport

Testrapporten ska innehålla följande information:

Testkemikalie:

— Källa, satsnummer, sista förbrukningsdag om detta anges.

— Testkemikaliens stabilitet i sig, om den är känd.

— Testkemikaliernas reaktionsbenägenhet med lösningsmedel/vehikel eller cellodlingsmedier.

— Löslighet och stabilitet av testkemikalien i lösningsmedlet, om detta är känt.

— Mätning av pH, osmolalitet och utfällningar i det odlingsmedium till vilket testkemikalien tillsattes, i förekommande fall.

Monokomponentämne:

— fysiskt utseende, vattenlöslighet och ytterligare relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper,

— kemiska beteckningar, såsom IUPAC- eller CAS-beteckning, CAS–nummer, SMILES- eller InChI-kod, strukturell formel, renhet, kemisk beteckning på föroreningar i förekommande fall och om möjligt osv.

Multikomponentämne, UVCB och blandningar:

— Karakteriseras så långt som möjligt genom kemisk beteckning (se ovan), kvantitativ förekomst och relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper hos beståndsdelarna.

Lösningsmedel:

— Motivering av valet av lösningsmedel.

— Procentandelen lösningsmedel i den slutliga odlingsmediet.

Celler:

— Cellernas typ och källa.

— Den använda celltypens lämplighet.

— Avsaknad av mykoplasma för cellinjer.

— Uppgifter om cellcykelns längd eller proliferationsindex.

— Om lymfocyter används, blodgivarnas kön, ålder och annan relevant information om givarna, helblod eller separerade lymfocyter, använd mitogen substans.

— Normal cellcykellängd (negativ kontroll).

— Antal passager för cellinjer om sådan information finns.

— Metoder för underhållet av cellodlingar för cellinjer.

— Det modala antalet kromosomer för cellinjer.

▼M7

Testbetingelser:

— Identitet för cytokinesinhiberande ämne (t.ex. cytoB), om sådant används, och ämnets koncentration samt cellexponeringens varaktighet

— Testkemikaliens koncentration, uttryckt som slutlig koncentration i odlingsmediet (t.ex. µg eller mg/mL eller mM av odlingsmediet).

— Grund för val av koncentrationer och antalet kulturer inklusive data för cytotoxicitet och löslighetsbegränsningar.

— Mediets sammansättning, CO_2-koncentration, om detta är tillämpligt, fuktighetsnivå.

— Koncentration (och/eller volym) av det lösningsmedel och den testkemikalie som tillsätts odlingsmediet.

— Inkubationstemperatur och tid.

— Behandlingens varaktighet.

— Tidpunkten för skörd efter behandlingen.

— Celldensitet vid inokulering, om tillämpligt.

— Typ och sammansättning hos det system som används för metabolisk aktivering (S9-källa, beredningsmetod för S9-blandningen, koncentration eller volym för S9-blandningen, S9 i det slutliga odlingsmediet, kvalitetskontroller av S9, t.ex. enzymatisk aktivitet, sterilitet, metabolisk kapacitet).

— Positiva och negativa kontrollkemikalier, slutkoncentrationer, behandlingsbetingelser och behandlingslängder samt återhämtningsperioder.

— Metoder för preparering av utstryksglas och färgningsteknik.

— Kriterier för klassificering av mikrokärnor i celler (urval av analyserbara celler samt identifiering av mikrokärnor).

— Antalet analyserade celler.

— Metoder för mätning av cytotoxicitet.

— All tilläggsinformation som är relevant rörande cytotoxicitet samt använd metod.

— Kriterier för att bedöma om testresultaten är positiva, negativa eller tvetydiga.

— Metod(er) för statistisk analys.

— Metoder, såsom användning av anti-kinetokor-antikroppar eller pancentromerspecifika prober, för att fastställa om mikrokärnorna innehåller hela eller fragmenterade kromosomer, om tillämpligt.

— Använda metoder för att bestämma pH, osmolalitet och utfällningar.

Resultat:

— Definition av godkända celler för analys.

— Utan cytoB, antal behandlade celler och antal skördade celler för varje odling om cellinjer används.

▼M7

— Mätning av använd cytotoxicitet, t.ex. CBPI eller RI när det gäller metoden för blockering av cytokines, RICC eller RPD när metoden för blockering av cytokines inte används, eventuella andra observationer (t.ex. cellkonfluens, apoptos, nekros, antal metafaser, frekvens för binukleära celler).

— Tecken på utfällning och tid för bestämningen.

— Data om behandlingsmediets pH och osmolalitet, om uppmätt.

— Fördelningen av mono-, bi- och multinukleära celler i fall där blockering av cytokines har använts.

— Antalet celler med mikrokärnor angivet separat för varje behandlad odling och kontrollodling och, där det är lämpligt, angivelse av huruvida det gäller binukleära eller mononukleära celler.

— Koncentration-responsförhållande, där det är möjligt.

— Data om parallella negativa (lösningsmedel) och positiva kontroller (koncentrationer och lösningsmedel).

— Historiska negativa (lösningsmedel) och positiva kontrolldata med intervall, medelvärden, standardavvikelser och 95 %-kontrollgränser för distribution samt antalet uppgifter.

— Statistisk analys, p-värden om sådana finns.

Diskussion av resultaten.

Slutsatser.

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, s. 1–4.

(3) Parry, J.M., A. Sors (1993). The detection and assessment of the aneugenic potential of environmental chemicals: the European Community aneuploidy project. *Mutation Research*, vol. 287/1, s. 3–15.

(4) Fenech, M., A.A. Morley (1985). Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay. *Cytobios,* vol. 43/172-173, s. 233–246.

(5) Kirsch-Volders, M. m.fl. (2000). Report from the *In Vitro* Micronucleus Assay Working Group. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, vol. 35/3, s. 167–172.

(6) Fenech, M. (2007). Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols,* vol. 2/5, s. 1084–1104.

(7) Fenech, M., A.A. Morley (1986). Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of *in-vivo* ageing and low dose X-irradiation. *Mutation Research,* vol. 161/2, s. 193–198.

(8) Eastmond, D.A., J.D. Tucker (1989). Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody. *Environmental and Molecular Mutagenesis,* vol. 13/1, s. 34–43.

▼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, s. 9–20.

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

(11) Farooqi, Z., F. Darroudi, A. T. Natarajan (1993). The use of fluorescence *in-situ* hybridisation for the detection of aneugens in cytokinesis-blocked mouse splenocytes. *Mutagenesis,* vol. 8/4, s. 329–334.

(12) Migliore, L. m.fl. (1993). Cytogenetic damage induced in human lymphocytes by four vanadium compounds and micronucleus analysis by fluorescence *in situ* hybridization with a centromeric probe. *Mutation Research,* vol. 319/3, s. 205–213.

(13) Norppa, H., L. Renzi, C. Lindholm (1993). Detection of whole chromosomes in micronuclei of cytokinesis-blocked human lymphocytes by antikinetochore staining and *in situ* hybridization. *Mutagenesis,* vol. 8/6, s. 519–525.

(14) Eastmond, D.A, D.S. Rupa, L.S. Hasegawa (1994). Detection of hyperdiploidy and chromosome breakage in interphase human lymphocytes following exposure to the benzene metabolite hydroquinone using multicolor fluorescence *in situ* hybridization with DNA probes. *Mutation Research,* vol. 322/1, s. 9–20.

(15) Marshall, R.R. m.fl. (1996). Fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) with chromosome-specific centromeric probes: a sensitive method to detect aneuploidy. *Mutation Research,* vol. 372/2, s. 233–245.

(16) Zijno, P. m.fl. (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 m.fl. (2003). Report from the *in vitro* micronucleus assay working group. *Mutation Research,* vol. 540/2, s. 153–163.

(18) Kapitel B.10 i denna bilaga: Test in vitro av kromosomavvikelser hos däggdjur.

(19) Lorge, E. m.fl. (2006). SFTG International collaborative Study on *in vitro* micronucleus test. I. General conditions and overall conclusions of the study. *Mutation Research,* vol. 607/1, s. 13–36.

(20) Clare, G. m.fl. (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test. II. Using human lymphocytes. *Mutation Research,* vol. 607/1, s. 37–60.

(21) Aardema, M.J. m.fl. (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, III. Using CHO cells. *Mutation Research,* vol. 607/1, s. 61–87.

(22) Wakata, A. m.fl. (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, IV. Using CHO/IU cells. *Mutation Research,* vol. 607/1, s. 88–124.

(23) Oliver, J. m.fl. (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, V. Using L5178Y cells. *Mutation Research,* vol. 607/1, s. 125–152.

(24) Albertini, S. m.fl. (1997). Detailed data on *in vitro* MNT and *in vitro* CA: industrial experience. *Mutation Research,* vol. 392/1-2, s. 187–208.

(25) Miller, B. m.fl. (1997). Comparative evaluation of the *in vitro* micronucleus test and the *in vitro* chromosome aberration test: industrial experience. *Mutation Research,* vol. 392/1-2, s. 45–59.

▼M7

(26) Miller, B. m.fl. (1998). Evaluation of the *in vitro* micronucleus test as an alternative to the *in vitro* chromosomal aberration assay: position of the GUM Working Group on the *in vitro* micronucleus test. Gesellschaft fur Umwelt-Mutations-forschung, *Mutation Research,* vol. 410, s. 81–116.

(27) Kalweit, S. m.fl. (1999). Chemically induced micronucleus formation in V79 cells – comparison of three different test approaches. *Mutation Research,* vol. 439/2, s. 183–190.

(28) Kersten, B. m.fl. (1999). The application of the micronucleus test in Chinese hamster V79 cells to detect drug-induced photogenotoxicity. *Mutation Research,* vol. 445/1, s. 55–71.

(29) von der Hude, W. m.fl. (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, s. 137–163.

(30) Garriott, M.L., J.B. Phelps, W.P. Hoffman (2002). A protocol for the *in vitro* micronucleus test, I. Contributions to the development of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 16 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity. *Mutation Research,* vol. 517/1-2, s. 123–134.

(31) Matsushima, T. m.fl. (1999). Validation study of the *in vitro* micronucleus test in a Chinese hamster lung cell line (CHL/IU). *Mutagenesis,* vol. 14/6, s. 569–580.

(32) Elhajouji, A., E. Lorge (2006). Special Issue: SFTG International collaborative study on *in vitro* micronucleus test. *Mutation Research,* vol. 607/1, s. 1–152.

(33) Kirkland, D. (2010). Evaluation of different cytotoxic and cytostatic measures for the *in vitro*micronucleus test (MNVit): Introduction to the collaborative trial. *Mutation Res*earch, vol. 702/2, s. 139–147.

(34) Hashimoto K. m.fl. (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, s. 28–36.

(35) Honma, M., M. Hayashi (2011). Comparison of *in vitro* micronucleus and gene mutation assay results for p53-competent versus p53-deficient human lymphoblastoid cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, vol. 52/5, s. 373–384.

(36) Zhang, L.S. m.fl. (1995). A comparative study of TK6 human lymphoblastoid and L5178Y mouse lymphoma cell lines in the *in vitro* micronucleus test. *Mutation Research Letters,* vol. 347/3-4, s. 105–115.

(37) ECVAM (2006). Statement by the European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM) Scientific Advisory Committee (ESAC) on the scientific validity of the *in vitro* micronucleus test as an alternative to the *in vitro* chromosome aberration assay for genotoxicity testing. ESAC:s 25:e möte den 16–17 november 2006. Finns 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. Finns på http://ecvam.jrc.it/index.htm.

(39) Corvi, R. m.fl. (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. m.fl. (1991). International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens, Genotoxicity under extreme culture conditions. A report from ICPEMC Task Group 9. *Mutation Research,* vol. 257/2, s. 147–205.

(42) Morita, T. m.fl. (1992). Clastogenicity of low pH to various cultured mammalian cells. *Mutation Research,* vol. 268/2, s. 297–305.

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

(44) Lång, L.H. m.fl. (2007). Different cytotoxic and clastogenic effects of epigallocatechin gallate in various cell-culture media due to variable rates of its oxidation in the culture medium. *Mutation Research,* vol. 634/1-2, s. 177–183.

(45) Nesslany, F. m.fl. (2008). Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid. *Environmental and Molecular Mutation.*, vol. 49, s. 439–452.

(46) Fenech, M., A.A. Morley (1985). Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutation Research,* vol. 147/1-2, s. 29–36.

(47) Fenech, M. (1997). The advantages and disadvantages of cytokinesis-blood micronucleus method. *Mutation Research,* vol. 392, s. 11–18.

(48) Payne, C.M. m.fl. (2010). Hydrophobic bile acid-induced micronuclei formation, mitotic perturbations, and decreases in spindle checkpoint proteins: relevance to genomic instability in colon carcinogenesis. *Nutrition and Cancer*, vol. 62/6, s. 825–840.

(49) Bazin, E. m.fl. (2010). Genotoxicity of a Freshwater Cyanotoxin,Cylindrospermopsin, in Two Human Cell Lines: Caco-2 and HepaRG. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, vol. 51/3, s. 251–259.

(50) Le Hegarat, L. m.fl. (2010). Assessment of the genotoxic potential of indirect chemical mutagens in HepaRG cellsby the comet and the cytokinesis-block micronucleus assays. *Mutagenesis*, vol. 25/6, s. 555–560.

(51) Josse, R. m.fl. (2012). An adaptation of the human HepaRG cells to the *in vitro* micronucleus assay. *Mutagenesis*, vol. 27/3, s. 295–304.

(52) Ehrlich, V. m.fl. (2002). Fumonisin B_1 is genotoxic in human derived hepatoma (HepG2) cells. *Mutagenesis,* vol. 17/3, s. 257–260.

(53) Knasmüller, S. m.fl. (2004). Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxicants; current state of knowledge. *Toxicology,* vol. 198/1-3, s. 315–328.

(54) Gibson, D.P. m.fl. (1997). Induction of micronuclei in Syrian hamster embryo cells: comparison to results in the SHE cell transformation assay for National Toxicology Program test chemicals. *Mutation Research,* vol. 392/1-2, s. 61–70.

(55) Bonassi, S. m.fl. (2001). HUman MicroNucleus Project: international database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes, I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria and host factors on the frequency of micronuclei. *Environmental and Molecular Mutagenesis,* vol. **37**/**1**, s. 31–45.

(56) Maron, D.M., B.N. Ames (1983). Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Research,* vol. 113/3-4, s. 173–215.

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

▼M7

(58) Elliott, B.M. m.fl. (1992). Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *in-vitro* genotoxicity assays. *Mutagenesis,* vol. 7, s. 175–177.

(59) Matsushima, T. m.fl. (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, s. 51–59.

(61) Unep (2001). Stockholmskonventionen om långlivade organiska föroreningar, FN:s miljöprogram (Unep). Finns 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, s. 225–228.

(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, s. 91–103.

(64) Zamora, P.O. m.fl. (1983). Evaluation of an exposure system using cells grown on collagen gels for detecting highly volatile mutagens in the CHO/HGPRT mutation assay. *Environmental Mutagenesis*, vol. 5/6, s. 795–801.

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

(66) Fenech, M. (1993). The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutation Research,* vol. 285/1, s. 35–44.

(67) Phelps, J.B., M.L. Garriott, W.P. Hoffman (2002). A protocol for the *in vitro* micronucleus test. II. Contributions to the validation of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 10 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity. *Mutation Research,* vol. 521/1-2, s. 103–112.

(68) Kirsch-Volders, M. m.fl. (2004). Corrigendum to ”Report from the *in vitro* micronucleus assay working group”. *Mutation Research,* 564, 97–100.

(69) Lorge, E. m.fl. (2008). Comparison of different methods for an accurate assessment of cytotoxicity in the *in vitro* micronucleus test. I. Theoretical aspects. *Mutation Research,* vol. 655/1-2, s. 1–3.

(70) Surralles, J. m.fl. (1995). Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research,* vol. 341/3, s. 169–184.

(71) Honma, M. (2011). Cytotoxicity measurement in *in vitro* chromosome aberration test and micronucleus test. *Mutation Research*, vol. 724, s. 86–87.

(72) Pfuhler, S. m.fl. (2011). *In vitro* genotoxicity test approaches with better predictivity: Summary of an IWGT workshop. *Mutation Research*, vol. 723/2, s. 101–107.

(73) OECD (2014). Document supporting the WNT decision to implement revised criteria for the selection of the top concentration in the *in vitro* mammalian cell assays on genotoxicity (testriktlinjer 473, 476 och 487). ENV/JM/TG(2014)17. Tillgänglig på begäran.

▼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, s. 32–56.

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

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

(77) Sobol, Z. m.fl. (2012). Development and validation of an *in vitro* micronucleus assay platform in TK6 cells. *Mutation Research*, vol.746/1, s. 29–34.

(78) Hayashi, M., T. Sofuni, M. Jr. Ishidate (1983). An Application of Acridine Orange Fluorescent Staining to the Micronucleus Test. *Mutation Research,* vol. 120/4, s. 241–247.

(79) MacGregor, J. T., C.M. Wehr, R.G. Langlois (1983). A Simple Fluorescent Staining Procedure for Micronuclei and RNA in Erythrocytes Using Hoechst 33258 and Pyronin Y. *Mutation Research,* vol. 120/4, s. 269–275.

(80) Bryce, S.M. m.fl. (2011). Miniaturized flow cytometry-based CHO-K1 micronucleus assay discriminates aneugenic and clastogenic modes of action. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, vol. 52/4, s. 280–286.

(81) Nicolette, J. m.fl. (2011). *in vitro* micronucleus screening of pharmaceutical candidates by flow cytometry in Chinese hamster V79 cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, vol. 52/5, s. 355–362.

(82) Shi, J., R. Bezabhie, A. Szkudlinska (2010). Further evaluation of a flow cytometric *in vitro* micronucleus assay in CHO-K1 cells: a reliable platform that detects micronuclei and discriminates apoptotic bodies. *Mutagenesis*, vol. 25/1, s. 33–40.

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

(84) Fenech, M. m.fl. (2003). HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research,* vol. 534/1-2, s. 65–75.

(85) Elhajouji, A., M. Cunha, M. Kirsch-Volders (1998). Spindle poisons can induce polyploidy by mitotic slippage and micronucleate mononucleates in the cytokinesis-block assay. *Mutagenesis*, vol. 13/2, s. 193–198.

(86) Kirsch-Volders, M. m.fl. (2011). The *in vitro* MN assay in 2011: origin and fate, biological significance, protocols, high throughput methodologies and toxicological relevance. *Archives of Toxicology*, vol. 85/8, s. 873–899.

(87) Hayashi, M. m.fl. (2010). Compilation and use of genetic toxicity historical control Data. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, vol.723/2, s. 87–90.

(88) Ryan, T. P. (2000). *Statistical Methods for Quality Improvement*. andra utgåvan, John Wiley & 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, s. 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. m.fl. (1987). Chromosome aberration and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, vol. 10/suppl. 10, s. 1–175.

▼**M7**

(92) Richardson, C. m.fl. (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

Tillägg 1

DEFINITIONER

Aneugen: en kemikalie eller en process som genom växelverkan med komponenterna i den mitotiska och meiotiska celldelningscykeln leder till aneuploidi i celler eller organismer.

Aneuploidi: alla avvikelser från det normala antalet diploida (eller haploida) kromosomer med en eller flera kromosomer, men inte med hela uppsättningar kromosomer (polyploidi).

Apoptos: programmerad celldöd som karakteriseras av en serie steg som leder till sönderfall av celler till membranbundna partiklar som därefter elimineras genom fagocytos eller avstötning.

Cellproliferation: ökning av antalet celler som resultat av mitotisk celldelning.

Centromer: den DNA-region på en kromosom där de båda kromatiderna hålls samman och på vilken de båda kinetokorerna är fästa på varsin sida.

Kemikalie: ett ämne eller en blandning.

Koncentrationer: slutliga koncentrationer av testkemikalien i odlingsmediet.

Klastogen: alla kemikalier eller händelser som orsakar strukturella kromosomavvikelser i populationer av celler eller eukaryota organismer.

Cytokines: den celldelning som följer omedelbart efter mitosen vid vilken två dotterceller bildas med var sin enskild kärna.

Proliferationsindex vid cytokinesinhibering (CBPI): förhållandet mellan antalet celler efter två delningar i den behandlade populationen och motsvarande antal i den obehandlade kontrollen (se tillägg 2 för formel).

Cytostas: inhibering av celltillväxt (se tillägg 2 för formel).

Cytotoxicitet: för försök med användning av cellinjer som omfattas av denna testmetod som utförs med tillsats av cytochalasin B avser cytotoxicitet en minskning av proliferationsindexet vid cytokinesinhibering (CBPI) eller replikeringsindexet (RI) i behandlade celler jämfört med den negativa kontrollen (se punkt 26 och tillägg 2).

För försök med användning av cellinjer som omfattas av denna testmetod som utförs i avsaknad av cytochalasin B avser cytotoxicitet en minskning av den relativa populationsfördubblingen (RPD) eller en relativ ökning av celltal (RICC) i behandlade celler jämfört med den negativa kontrollen (se punkt 27 och tillägg 2).

Gentoxisk: allmän term som omfattar alla typer av DNA- eller kromosomskador, inklusive brott, deletioner, addukter, modifieringar av och kopplingar mellan nukleotider, omlagringar, genmutationer, kromosomavvikelser och aneuploidi. Inte alla typer av genotoxiska effekter leder till mutationer eller stabila kromosomskador.

Interfasceller: celler som inte är i mitotisk fas.

Kinetokor: en proteinstruktur som bildas vid centromeren på en kromosom och till vilken kärnspolefibrer binds under celldelning, vilket möjliggör en ordnad rörelse av dotterkromosomerna mot dottercellernas poler.

▼M7

Mikrokärnor: Små extra kärnor som är separata från cellernas huvudkärna och som produceras under mitosens eller meiosens telofas från isolerade kromosomfragment eller hela kromosomer.

Mitos: delning av cellkärnan, i regel bestående av profas, prometafas, metafas, anafas och telofas.

Mitotiskt index: den andel celler som är i metafas delat med det totala antalet celler som kan observeras i en cellpopulation; en indikation på graden av celltillväxt hos den populationen.

Mutagent ämne: ämne som producerar en ärftlig ändring av DNA-basparssekvensen (-sekvenserna) i gener eller i kromosomstrukturen (kromosomavvikelser).

Icke-disjunktion: När kromatidpar inte separeras och segregeras korrekt till dottercellerna under utveckling, vilket leder till dotterceller med onormalt antal kromosomer.

p53-status: p53-proteinet är involverat i cellcykelreglering, apoptos och DNA-reparation. Celler som lider brist på funktionellt p53-protein och är oförmögna att stoppa cellcykeln eller eliminera skadade celler via apoptos eller andra mekanismer (t.ex. induktion av DNA-reparation) i samband med p53-funktioner till svar på en DNA-skada, bör teoretiskt sett vara mer benägna till genmutationer eller kromosomavvikelser.

Polyploidi: Numeriska kromosomavvikelser i celler eller organismer som inbegriper en eller flera hela kromosomuppsättningar, i motsats till en enskild kromosom eller kromosomer (aneuploidi).

Proliferationsindex (PI): Ett sätt att mäta cytotoxicitet när cytoB inte används (se tillägg 2 för formel).

Relativ ökning av celltal (RICC): Ett sätt att mäta cytotoxicitet när cytoB inte används (se tillägg 2 för formel).

Relativ populationsfördubbling (RPD): Ett sätt att mäta cytotoxicitet när cytoB inte används (se tillägg 2 för formel).

Replikeringsindex (RI): Andelen celldelningscykler som slutförts i en behandlad odling under exponeringsperioden och återhämtningen, i förhållande till den obehandlade kontrollen (se tillägg 2 för formel).

S9-leverfraktion: supernatant av leverhomogenat efter 9 000 g centrifugering, dvs. råleverextrakt.

S9-blandning: blandning av S9-leverfraktion och kofaktorer som krävs för metaboliska enzymers aktivitet.

Lösningsmedelskontroll: Allmän term för att definiera kontrollodlingar där endast lösningsmedel används för att lösa upp testkemikalien.

Testkemikalie: alla ämnen eller blandningar som testas med denna testmetod.

Obehandlad kontroll: odlingar som inte behandlas (dvs. varken testkemikalie eller lösningsmedel tillsätts), men som behandlas parallellt på samma sätt som de odlingar där testkemikalien tillsätts.

▼M7

Tillägg 2

FORMLER FÖR BESTÄMNING AV CYTOTOXICITET

När cytoB används ska bedömningen av cytotoxicitet basera sig på **proliferationsindex vid cytokinesinhibering (CBPI) eller replikeringsindex (RI)** (17) (69). CBPI anger det genomsnittliga antalet kärnor per cell och kan användas för att beräkna cellproliferationen. Replikeringsindex indikerar det relativa antalet cellcykler per cell under exponeringsperioden för cytoB i behandlade odlingar i jämförelse med kontrollodlingar och kan användas för att beräkna procentandelen cytostas:

$$\% \text{ cytostas} = 100\text{-}100\{(\text{CBPI}_T - 1) \div (\text{CBPI}_C - 1)\}$$

och

T = odling behandlad med testkemikalie

C = kontrollodling

där

$$\text{CBPI} = \frac{((\text{antal mononukleära celler}) + (2 \times \text{antal binukleära celler}) + (3 \times \text{antal multinukleära celler}))}{(\text{totalt antal celler})}$$

Således gäller att ett CBPI-värde på 1 (alla celler är mononukleära) motsvarar 100 % cytostas.

Cytostas = 100 − RI

$$\text{RI} = \frac{((\text{antal binukleära celler}) + (2 \times \text{antal multinukleära celler}))/(\text{totalt antal celler})_T}{((\text{antal binukleära celler}) + (2 \times \text{antal multinukleära celler}))/(\text{totalt antal celler})_C} \times 100$$

T = behandlade odlingar

C = kontrollodlingar

Således betyder ett RI-värde på 53 % att, jämfört med antalet celler som har delat sig till binukleära och multinukleära celler i kontrollodlingen, endast 53 % av detta antal har delat sig i den behandlade odlingen, dvs. 47 % cytostas.

När cytoB inte används, rekommenderas att cytotoxiciteten utvärderas på grundval av **relativ ökning av celltal (RICC)** eller **relativ populationsfördubbling (RPD)** (69), eftersom den andel av cellpopulationen som har delat sig beaktas i båda metoderna.

$$\textbf{RICC}(\%) = \frac{(\text{ökning av antalet celler i behandlade kulturer(slutligt–initialt))}}{(\text{ökning av antalet celler i kontrollkulturer(slutligt–initialt))}} \times 100$$

$$\textbf{RPD}(\%) = \frac{(\text{antal populationsfördubblingar i behandlade kulturer})}{(\text{antal populationsfördubblingar i behandlade kulturer})} \times 100$$

där

Populationsfördubbling: [log (Cellantal efter behandling ÷ Ursprungligt cellantal)] ÷ log 2

Således indikerar ett RICC-värde eller ett RPD-värde på 53 % att det förekommer 47 % cytotoxicitet/cytostas.

▼M7

Genom att använda ett **proliferationsindex (PI)** kan cytotoxiciteten bestämmas genom att räkna antalet kloner som består av 1 cell (cl1), 2 celler (cl2), 3 till 4 celler (cl4) och 5 till 8 celler (cl8).

$$PI = \frac{((1 \times cl1) + (2 \times cl2) + (3 \times cl4) + (4 \times cl8))}{(cl1 + cl2 + cl4 + cl8)}$$

PI har använts som en värdefull och tillförlitlig cytotoxicitetsparameter även för cellinjer som har odlats in vitro utan tillsats av cytoB (35) (36) (37) (38) och kan anses utgöra en användbar ytterligare parameter.

I alla händelser bör antalet celler före behandling vara detsamma för behandlade och negativa kontrollodlingar.

Tidigare användes RCC (dvs. antalet celler i behandlade kulturer/antalet celler i kontrollkulturer) som cytotoxicitetsparameter, men rekommenderas inte längre eftersom cytotoxiciteten kan underskattas enligt detta mått.

Vid användning av automatiska klassificeringssystem, t.ex. flödescytometri, laserskanningcytometri eller bildanalys, kan antalet celler i formeln ersättas med antalet kärnor.

I de negativa kontrollodlingarna bör populationsfördubbling eller replikatindex överensstämma med kravet att provta celler efter behandlingen vid en tidpunkt som motsvarar cirka 1,5–2,0 gånger den normala cellcykeln.

▼M3

B.50. **HUDSENSIBILISERING: LLNA-METODEN (LOCAL LYMPH NODE ASSAY): DA**

INLEDNING

1. OECD:s riktlinjer för testning av kemikalier (OECD Guidelines for the Testing of Chemicals) och EU:s testmetoder ses regelbundet över med hänsyn till den vetenskapliga utvecklingen, nya lagstiftningsbehov och djurens välbefinnande. Den första testmetoden (B.42) för bestämning av hudsensibilisering hos möss (LLNA-metoden, OECD:s testriktlinje 429) har reviderats (1). Närmare uppgifter om valideringen av LLNA-metoden och en granskning av arbetet i samband med denna har offentliggjorts (2)(3)(4)(5)(6)(7)(8)(9). I LLNA-metoden används radioisotopiskt tymidin eller jod för att mäta lymfocytproliferation och metoden har därför begränsad användning när det förekommer problem med att anskaffa, använda eller bortskaffa radioaktivitet. LLNA: DA (som utvecklats av Daicel Chemical Industries, Ltd) är en icke-radioaktiv modifiering av LLNA enligt vilken mängden adenosintrifosfat (ATP) kvantifieras genom bioluminiscens som en indikator på lymfocytproliferation. LLNA: DA-testmetoden har validerats, granskats och rekommenderats av en internationell expertutvärderingspanel som konstaterade att den kan användas för att identifiera hudsensibiliserande och icke-hudsensibiliserande kemikalier, med vissa begränsningar (10)(11)(12)(13). Testmetoden är avsedd för bedömning av kemikaliers (ämnens och blandningars) potential att framkalla hudsensibilisering hos djur. Enligt kapitel B.6 i denna bilaga och i OECD:s testriktlinje 406 används test på marsvin, särskilt maximeringstest på marsvin och Buehler-test (14). LLNA (kapitel B.42 i denna bilaga, OECD:s testriktlinje 429) och de två icke-radioaktiva modifikationerna LLNA: DA (kapitel B.50 i denna bilaga, OECD:s testriktlinje 442 A) och LLNA: BrdU-ELISA (kapitel B.51 i denna bilaga, OECD:s testriktlinje 442 B) har fördelar jämfört med marsvinstestet enligt B.6 och OECD:s testriktlinje 406 (14) såtillvida att man kan minska antalet djur och använda dem på ett skonsammare sätt.

2. I likhet med LLNA används LLNA: DA för att undersöka hudsensibiliseringens induktionsfas, vilket ger tillgång till kvantitativa data som är lämpliga för dos-responsbedömning. Vidare gäller att de här metodernas förmåga att detektera hudsensibiliserande kemikalier utan att det behövs radiomärkning för DNA eliminerar risken för yrkesmässig exponering för radioaktivitet och problem rörande bortskaffning av avfall. Detta kan i sin tur ge möjlighet till ökad användning av möss för att upptäcka hudsensibiliserande ämnen, vilket ytterligare kan minska användningen av marsvin för att testa kemikaliers hudsensibiliserande potential (dvs. B.6; OECD:s testriktlinje 406) (14).

DEFINITIONER

3. Definitioner av begreppen finns i tillägg 1.

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN OCH BEGRÄNSNINGAR

4. LLNA: DA är en modifierad LLNA-metod för identifiering av kemikalier med potential att framkalla hudsensibilisering, med specifika begränsningar. Detta betyder dock inte nödvändigtvis att LLNA: DA alltid ska användas i stället för LLNA eller test på marsvin (dvs. B.6; OECD:s testriktlinje 406) (14), utan att metoden är likvärdig och kan användas som ett alternativ i fall där positiva och negativa resultat i regel inte kräver någon ytterligare bekräftelse (10) (11). Testningslaboratoriet bör analysera all tillgänglig information om testämnet innan själva testningen genomförs. Sådan information inbegriper ämnets identitet och kemiska struktur, fysikalisk-kemiska egenskaper,

▼M3

resultaten från andra eventuella *in vitro*- eller *in vivo*-test avseende testämnets toxicitet samt toxikologiska data om strukturellt närbesläktade kemikalier. Denna information bör övervägas för att kunna fastställa om LLNA-metoden är lämplig för testämnet (mot bakgrund av att LLNA-metoden inte kan användas för vissa typer av kemikalier, se punkt 5) och som stöd för valet av dos.

5. LLNA: DA är en *in vivo*-metod, och därför kan man inte undvika användningen av djur för bedömning av sensibilisering genom allergisk kontakt. Detta test erbjuder dock möjligheter till att minska antalet djur i jämförelse med test på marsvin (B.6; OECD:s testriktlinje 406) (14). Dessutom ger LLNA: DA möjlighet till en betydligt skonsammare behandling (mindre smärta och lidande) av de djur som används för testning av sensibilisering genom allergisk kontakt, eftersom man med LLNA: DA, till skillnad från B.6 och OECD:s testriktlinje 406 inte behöver framkalla provokationsinducerade dermala hypersensitivitetsreaktioner. Trots fördelarna med LLNA: DA i jämförelse med B.6 och OECD:s testriktlinje 406 (14), finns det vissa begränsningar som gör att man kanske måste använda B.6 eller OECD:s testriktlinje 406 (t.ex. testning av vissa metaller, falska positiva resultat med vissa hudirriterande ämnen (såsom vissa ytaktiva ämnen (6) (1 och kapitel B.42 i denna bilaga), testämnets löslighet)). Dessutom kan det för kemiska klasser eller ämnen som har funktionella grupper som påvisats agera som potentiella störfaktorer (16) vara nödvändigt att använda test på marsvin (dvs. B.6; OECD:s testriktlinje 406 (14)). Det rekommenderas att de begränsningar som anges för LLNA (1 och kapitel B.42 i denna bilaga) även ska gälla för LLNA: DA (10). Dessutom är LLNA: DA eventuellt inte lämplig för testning av ämnen som påverkar ATP-nivåerna (t.ex. ämnen som fungerar som ATP-inhibitorer) eller ämnen som stör exakt mätning av intracellulärt ATP (t.ex. förekomsten av ATP-degraderande enzymer eller förekomst av extracellulärt ATP i lymfnoden). Utöver sådana identifierade begränsningar bör LLNA: DA gå att använda för testning av alla ämnen, utom om ett ämne förknippas med egenskaper som kan påverka LLNA: DA-metodens exakthet. Dessutom bör överväganden göras rörande risken för positiva gränsresultat när man får värden för stimulationsindex (SI) mellan 1,8 och 2,5 (se punkterna 31–32). Detta grundar sig på valideringsdatabasen med 44 ämnen med användning av SI ≥ 1,8 (se punkt 6) för vilka LLNA: DA ger korrekt identifiering av alla 32 sensibiliserande ämnen enligt LLNA men felaktig identifiering av 3 av 12 icke-sensibiliserande ämnen enligt LLNA med SI-värden mellan 1,8 och 2,5 (dvs. på gränsen till positivt) (10). Eftersom samma datauppsättning användes för att fastställa SI-värdena och beräkna testmetodens förutsägande egenskaper kan dock de angivna resultaten vara en överuppskattning av de faktiska förutsägande egenskaperna.

PRINCIP FÖR TESTMETODEN

6. LLNA: DA bygger på principen om att sensibiliserande ämnen inducerar en primär proliferation av lymfocyter i de lymfnoder som dränerar det område där testämnet appliceras. Denna proliferation står i proportion till den applicerade dosen och det allergiframkallande ämnets styrka, och är ett enkelt sätt att få en kvantitativ mätning av sensibiliseringen. Proliferationen mäts genom att jämföra medelproliferationen i varje testgrupp med medelproliferationen i den vehikelbehandlade kontrollgruppen. Förhållandet mellan medelproliferationen i respektive behandlingsgrupp och den parallella vehikelkontrollgruppen, kallat stimulationsindex (SI), bestäms och detta bör vara ≥ 1,8 för att det ska vara motiverat att klassificera testämnet som potentiellt

▼M3

hudsensibiliserande ämne. Det förfarande som beskrivs här grundar sig på mätning av ATP-innehållet (som korrelerar med antalet levande celler) genom bioluminiscens (17) i syfte att indikera ett ökat antal prolifererande celler i de aurikulära dränerande lymfnoderna (18) (19). I bioluminiscensmetoden används enzymet luciferas för att katalysera ombildningen till ljus från ATP och lucifering enligt följande reaktion:



$$ATP + luciferin + O_2 \xrightarrow{luciferase} oxiluciferin + AMP + PP_i + CO_2 + ljus$$

Det emitterade ljusets intensitet är linjärt relaterat till ATP-koncentrationen och uppmäts med en luminometer. Luciferin-luciferas-förfarandet är en känslig metod för ATP-kvantifiering som används i en mängd olika tillämpningar (20).

TESTBESKRIVNING

Val av djurart

7. För detta test används mus. Valideringsstudier för LLNA: DA genomfördes uteslutande med stammen CBA/J som därför anses vara den stam som är att föredra (12) (13). I testet används unga vuxna mushonor som inte har fött ungar och som inte är dräktiga. När försöket inleds bör djuren vara 8–12 veckor gamla. Djurens viktvariation bör vara minimal och får inte överskrida 20 % av medelvikten. Övriga stammar eller hanar kan användas som alternativ förutsatt att det finns tillräckliga data som stöd för att det inte förekommer några betydande stam- eller könsberoende skillnader i LLNA: DA-respons.

Inhysnings- och utfodringsförhållanden

8. Mössen ska inhysas i grupper (21), utom om det finns tillbörlig vetenskaplig motivering för individuell inhysning. Temperaturen i djurens utrymmen bör vara 22 ± 3 °C. Den relativa fuktigheten bör vara minst 30 % och ska helst inte överstiga 70 %, utom när rummet rengörs. Målvärdet bör dock vara 50–60 %. Belysningen bör vara artificiell med omväxlande 12 timmar ljus och 12 timmar mörker. För utfodringen kan konventionellt laboratoriefoder användas, och djuren bör ha obegränsad tillgång till dricksvatten.

Förberedelse av djuren

9. Djuren väljs ut slumpmässigt och förses med märkning så att de kan identifieras individuellt (öronmärkning får dock inte användas). Därefter får djuren acklimatisera sig till laboratoriets förhållanden i sina burar i minst fem dagar före doseringsstart. Innan behandlingen inleds undersöks alla djur för att säkerställa att de inte har några synliga hudskador.

Förberedelse av doseringslösningar

10. Kemikalier i fast form ska upplösas eller suspenderas i lösningsmedel/vehikel och vid behov spädas ut före appliceringen på mössens öron. Kemikalier i vätskeform kan appliceras i ren eller utspädd form. Olösliga kemikalier, av den typ som ofta används i medicintekniska produkter, ska före applicering på mössens öron extraheras kraftigt i lämpligt lösningsmedel för att få ut alla extraherbara beståndsdelar för testning. Testlösningarna ska beredas dagligen utom om stabilitetsdata visar att lagring kan accepteras.

▼M3

Tillförlitlighetskontroll

11. Positiva kontrollkemikalier används för att påvisa att testsystemet klarar av att ge respons med tillräcklig och reproducerbar känslighet för ett sensibiliserande testämne för vilket responsen har en välkarakteriserad styrka. Användningen av en parallell positiv kontroll rekommenderas eftersom den påvisar laboratoriets kompetens att genomföra testningar på ett framgångsrikt sätt och ger möjlighet att bedöma reproducerbarhet och jämförbarhet inom laboratoriet och mellan laboratorier. Vissa tillsynsmyndigheter kräver också att positiv kontroll används för varje försök, och därför rekommenderas samråd med relevanta myndigheter innan testning med LLNA: DA inleds. Likaså uppmuntras rutinanvändning av parallell positiv kontroll för att undvika tilläggstestning på djur i fall där myndigheterna inte godkänner periodiska positiva kontroller (se punkt 12). Den positiva kontrollen bör ge en positiv LLNA: DA-respons på den exponeringsnivå som förväntas ge en ökning av stimulationsindex (SI) som är större eller lika med 1,8 i förhållande till den negativa kontrollgruppen. Dosen för den positiva kontrollkemikalien ska väljas så att den inte orsakar särskilt kraftig hudirritation eller systemisk toxicitet och att induktionen är reproducerbar men inte för kraftig (t.ex. SI > 10 anses vara för högt värde). Rekommenderade ämnen för positiv kontroll är 25-procentig hexylkanelaldehyd (CAS-nummer 101-86-0) och 25-procentig eugenol (CAS-nummer 97-53-0) i aceton-olivoljeblandning i förhållandet 4:1 (volym/volym). I vissa fall kan även andra positiva kontrollkemikalier som uppfyller de ovan angivna kriterierna användas, förutsatt att tillbörlig motivering kan ges.

12. Även om användning av en parallell positiv kontrollgrupp rekommenderas kan det finnas betingelser där det är tillräckligt med periodisk testning (dvs. minst var sjätte månad) av den positiva kontrollen i laboratorier som regelbundet genomför LLNA: DA (dvs. minst en gång i månaden) och som har en etablerad historisk databas över positiv kontroll som påvisar laboratoriets förmåga att få reproducerbara och exakta resultat från positiva kontroller. Tillräcklig kvalitet hos LLNA: DA kan framgångsrikt påvisas genom att enhetliga positiva resultat erhålls från den positiva kontrollen vid minst tio oberoende testningar som genomförs inom en skälig tidsperiod (kortare än ett år).

13. Parallell positiv kontrollgrupp ska alltid användas när det sker ändringar rörande testningsförfarandet (t.ex. ny personal, nya material och/eller reagenser, annorlunda utrustning, byte av testdjurens ursprung), och sådana ändringar bör dokumenteras i laboratorierapporter. Man bör överväga om dessa ändringar påverkar den tidigare etablerade historiska databasens lämplighet, för att kunna avgöra om det behövs en ny historisk databas för dokumentering av den positiva kontrollens resultatenhetlighet.

14. Man bör vara medveten om att beslut om att använda positiva kontroller med vissa intervaller i stället för parallellt har återverkningar på lämpligheten och godtagbarheten hos negativa undersökningsresultat som fås utan parallell positiv kontroll under den tid som löper mellan de periodiska undersökningarna av positiv kontroll. Om t.ex. falska negativa resultat fås vid ett periodiskt test av positiv kontroll, måste man kanske ifrågasätta resultat som erhållits mellan det sista godtagbara periodiska testet av positiv kontroll och ett icke-godtagbart periodiskt test med positiv kontroll. Följderna av dessa utfall bör övervägas noggrant när man avgör huruvida parallella positiva kontroller ska användas eller om de positiva kontrollerna enbart ska vara periodiska. Likaså bör man överväga användning av färre djur i den parallella positiva kontrollgruppen när detta är vetenskapligt motiverat och laboratoriet med stöd av laboratoriespecifika historiska data kan påvisa att färre möss kan användas (22).

▼M3

15. Även om det positiva kontrollämnet bör testas i en vehikel som veterligen framkallar en enhetlig respons (t.ex. aceton-olivoljeblandning i förhållandet 4:1 (volym/volym)), kan det förekomma vissa föreskriftsreglerade situationer där det även behövs testning i en icke-standardmässig vehikel (kliniskt och kemiskt relevant formulering) (23). Om det parallella positiva kontrollämnet testas i en annan vehikel än den som används för testämnet, bör en separat kontrollgrupp användas för den parallella positiva kontrollen.

16. I fall där utvärdering görs av testämnen av en viss kemisk klass eller med en viss responsskala kan det också vara värdefullt med referensämnen för att påvisa att testmetoden fungerar tillfredsställande för bestämning av hudsensibiliseringspotentialen hos dessa typer av ämnen. Ett lämpligt referensämne ska ha följande egenskaper:

— Strukturell och funktionell likhet med den ämnesklass som testas.

— Kända fysikalisk-kemiska egenskaper.

— Stödjande data från LLNA: DA.

— Stödjande data från andra djurmodeller och/eller från människor.

TESTFÖRFARANDE

Antalet djur och dosnivåer

17. Minst fyra djur per dosgrupp och minst tre koncentrationer av testämnet bör användas. Dessutom används en parallell negativ kontrollgrupp som endast behandlas med samma vehikel som används för testämnet och en positiv kontroll (parallell eller nyligen gjord, enligt laboratoriets principer för överväganden enligt punkterna 11–15). Man bör överväga flera upprepade doser av det positiva kontrollämnet, särskilt när den positiva kontrollen testas periodiskt. Med undantag för behandling med testämnet bör djuren i kontrollgrupperna hanteras på exakt samma sätt som djuren i dosgrupperna.

18. Doserna och vehikeln bör väljas på grundval av rekommendationerna i hänvisningarna 0 och (24). Doserna väljs i regel enligt en lämplig koncentrationsserie såsom 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 %, osv. Valet av koncentrationsserie ska ges tillbörlig vetenskaplig motivering. All existerande tillgänglig och relevant toxikologisk information (t.ex. akut toxicitet och hudirritation) samt strukturell och fysikalisk-kemisk information om testämnet (och/eller strukturellt besläktade ämnen) bör övervägas vid valet av de tre på varandra följande koncentrationerna så att den högsta koncentrationen ger maximal exponering samtidigt som systemisk toxicitet och särskilt kraftig lokal hudirritation undviks (24) (25). Om sådan information inte finns kan det vara nödvändigt att först genomföra ett preliminärt screeningtest (se punkterna 21–24).

19. Vehikeln får inte störa eller snedvrida testresultaten och ska väljas med tanke på största möjliga löslighet för att få högsta möjliga koncentration samtidigt som man får en lösning/suspension som är lämplig för applicering av testämnet. Som vehikel rekommenderas aceton-olivoljeblandning (4:1 volym/volym), *N,N*-dimetylformamid, metyletylketon, propylenglykol och dimetylsulfoxid (6) men även andra vehiklar kan användas förutsatt att tillräcklig vetenskaplig motivering kan ges. I vissa situationer kan det vara nödvändigt att som extra kontroll använda ett kliniskt relevant lösningsmedel eller en kommersiellt tillgänglig blandning där testämnet ingår. Särskild vikt bör fästas vid att säkerställa att hydrofila ämnen inkorporeras i ett vehikelsystem som väter huden och som inte omedelbart rinner bort, genom att använda lämpliga solubiliserande ämnen (t.ex. 1-procentig Pluronic® L92). Det betyder att helt vattenbaserade vehiklar bör undvikas.

▼M3

20. Genom analys av lymfnoder från individuella möss kan man bestämma variationer djuren emellan och göra en statistisk jämförelse av skillnaden mellan mätningar för testämnet och mätningarna i kontrollgruppen (se punkt 33). Dessutom kan möjligheten att minska antalet möss i den positiva kontrollgruppen endast övervägas utifrån att data samlas in individuellt per djur (22). Vidare gäller att vissa tillsynsmyndigheter kräver att data insamlas per individuellt djur. Regelbunden insamling av individuella data per djur ger en fördel rörande djurens välbefinnande eftersom man kan undvika upprepad testning som annars skulle behövas om testämnesresultat som ursprungligen har samlats in på ett visst sätt (t.ex. genom poolade djurdata) måste granskas senare av tillsynsmyndigheter som har avvikande krav (såsom data per individuellt djur).

Preliminärt screeningtest

21. Om det inte finns tillgång till information för att bestämma högsta testdosen (se punkt 18) bör ett preliminärt screeningtest genomföras för att definiera den lämpliga dosnivån för test i LLNA: DA. Syftet med det preliminära screeningtestet är att ge vägledning för valet av högsta dosnivå som ska användas i den huvudsakliga LLNA: DA-undersökningen i fall där det inte finns tillgång till information om vilken koncentration som inducerar systemisk toxicitet (se punkt 24) och/eller särskilt kraftig lokal hudirritation (se punkt 23). Den högsta dosnivå som testas ska vara 100 % testämne för vätskor eller högsta möjliga koncentration för fasta ämnen eller suspensioner.

22. Det preliminära screeningtestet genomförs under identiska betingelser som vid den huvudsakliga LLNA: DA-undersökningen, utom att man inte utvärderar proliferationen i lymfnoderna och man kan använda färre djur i dosgruppen. Ett eller två djur per dosgrupp föreslås. Alla möss observeras dagligen för kliniska tecken på systemisk toxicitet eller lokal irritation på appliceringsstället. Djurens kroppsvikt registreras före testningen och efter avslutad testning (dag 8). På varje mus observeras båda öronen i fråga om hudrodnad och graderas enligt tabell 1 (25). Mätning av örontjocklek görs t.ex. med digital mikrometer eller Peacock Dial-instrument på dag 1 (före dosering), dag 3 (cirka 48 timmar efter den första dosen), dag 7 (24 timmar före avslut) och dag 8. Dessutom kan örontjockleken bestämmas på dag 8 genom vägning av en öronbit som stansats ut efter att djuren har avlivats skonsamt. Särskilt kraftig lokal hudirritation indikeras genom hudrodnadsgradering ≥ 3 och/eller ökning av örontjockleken med ≥ 25 % på någon av mätningsdagarna (26) (27). Den högsta dos som väljs för den huvudsakliga LLNA: DA-undersökningen blir nästa lägre dos i koncentrationsserien för den preliminära screeningen (se punkt 18) som inte inducerar systemisk toxicitet och/eller särskilt kraftig hudirritation.

Tabell 1

Grader av hudrodnad

Observation	Gradering
Ingen hudrodnad	0
Mycket svag rodnad (knappt skönjbar)	1
Väldefinierad hudrodnad	2

▼M3

Observation	Gradering
Moderat till svår hudrodnad	3
Svår hudrodnad (köttrodnad) till sårskorpebildning som utgör hinder för gradering av rodnaden	4

23. Utöver en 25-procentig ökning av örontjocklek (26) (27) har en statistiskt signifikant ökning av örontjockleken hos behandlingsgruppens möss i jämförelse med kontrollgruppens möss också använts för att identifiera irriterande ämnen genom LLNA (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34). Dock så gäller att även om statistiskt signifikanta ökningar kan inträffa när ökningen av örontjocklek är mindre än 25 %, har dessa inte specifikt förknippats med särskilt kraftig irritation (30) (31) (32) (33) (34).

24. Följande kliniska observationer kan indikera systemisk toxicitet (35) när de används som del av en helhetsbedömning, och kan därför ge hänvisning om den högsta dosnivå som ska användas i det huvudsakliga LLNA: DA-försöket: ändringar av nervsystemets funktion (t.ex. upprest päls, ataxi, skälvningar och konvulsioner), ändringar av beteende (t.ex. aggressivitet, ändringar av putsningsbeteende, markerad ändring av aktivitetsnivå), ändringar av andningsmönster (dvs. ändringar av andningens frekvens och intensitet, såsom dyspné, gäspande och rassel) samt ändringar av födo- och vattenintag. Vid utvärderingen ska man också beakta tecken på letargi och/eller avsaknad av reaktioner, alla slags kliniska tecken på mer än lätt eller momentan smärta eller lidande, en minskning på mer än 5 % av kroppsvikten från dag 1 till dag 8 samt mortalitet. Döende djur och djur som visar tecken på svår smärta och lidande ska avlivas skonsamt (36).

Huvudundersökningens försöksschema

25. För testet används följande försöksschema:

— *Dag 1:* Djuren märks individuellt och vikten samt eventuella kliniska observationer registreras. Applicera en 1-procentig vattenlösning av natriumlaurylsulfat (SLS) på baksidan av varje öra med en borste doppad i lösningen och täck örats hela baksida med fyra till fem strykningar. En timme efter SLS-behandlingen appliceras 25 µl lämpligt utspätt testämne, enbart vehikel eller positivt kontrollämne (parallell eller nyligen gjord positiv kontroll, i enlighet med laboratoriets principer rörande punkterna 11–15) på båda öronens baksida.

— *Dagarna 2, 3 och 7:* Upprepa förbehandlingen med 1-procentig SLS-vattenlösning och applicera testämnet på samma sätt som på dag 1.

— *Dagarna 4, 5 och 6:* Ingen behandling.

— *Dag 8:* Registrera vikten för varje djur och eventuella kliniska observationer. Avliva djuren skonsamt cirka 24–30 timmar efter appliceringsstarten dag 7. Skär bort de aurikulära dränerande lymfnoderna från varje musöra och behandla separat i fosfatbuffrad saltlösning (PBS) för varje djur. Närmare uppgifter och scheman för identifiering och dissekering av noder finns i hänvisning (22). För ytterligare kontroll av lokal hudrespons i huvudundersökningen kan tilläggsparametrar såsom gradering av örats hudrodnad eller mätningar av örats tjocklek (med tjockleksmätare eller genom vägning av utstansad bit vid obduceringen) införlivas i undersökningsprotokollet.

▼M3

Beredning av cellsuspensioner

26. För varje mus bereds en suspension med enskilda celler av de bilateralt bortskurna lymfnodscellerna (LNC) genom att placera lymfnoderna mellan två objektglas som trycks lätt samman för att krossa noderna. Kontrollera att vävnaden har spritt ut sig i ett tunt skikt och dra isär de två objektglasen. Bered en suspension av vävnaden på båda objektglasen genom att hålla dem ett i sänder i vinkel över en Petriskål och skölja med fosfatbuffrad saltlösning och skrapa samtidigt loss vävnaden med en cellskrapa. Observera att lymfnoderna i den negativa kontrollgruppens djur är små, och det är viktigt att iaktta stor försiktighet för att inte åstadkomma störande inverkan på SI-värdena. Totalt används 1 ml fosfatbuffrad saltlösning för sköljning av båda objektglasen. Gör en lätt homogenisering av LNC-suspensionen i Petriskålen med hjälp av cellskrapan. Dra upp en alikvot på 20 µl ur LNC-suspensionen med mikropipett och var försiktig med att inte ta upp membran som kan ses med blotta ögat, och blanda sedan med 1,98 ml fosfatbuffrad saltlösning till en provvolym på 2 ml. Bered sedan ett andra prov på 2 ml genom samma förfarande så att det finns två prov beredda per djur.

Bestämning av cellproliferation (mätning av lymfocyternas ATP-innehåll)

27. Ökning av ATP-innehållet i lymfnoderna mäts genom luciferin-luciferas-metoden med användning av ett system för ATP-mätning som mäter bioluminiscensen som relativa ljusenheter (Relative Luminescence Units, RLU). Tiden mellan avlivning av ett djur fram till mätning av ATP-innehållet bör vara enhetlig, inom cirka 30 minuter, eftersom man anser att ATP-innehållet gradvis minskar med tiden efter avlivningen (12). Serien av förfaranden från bortskärning av de aurikulära lymfnoderna fram till ATP-mätning bör därför slutföras inom 20 minuter enligt det på förhand fastställda tidsschemat som är samma för varje djur. ATP-luminiscensen bör mätas för varje 2 ml-prov så att totalt två ATP-mätningar görs per djur. Genomsnittet för ATP-luminiscens bestäms och används därefter för beräkningarna (se punkt 30).

OBSERVATIONER

Kliniska observationer

28. Varje mus bör observeras minst dagligen med tanke på eventuella kliniska tecken – lokal irritation vid appliceringsstället eller tecken på systemisk toxicitet. Alla observationer registreras systematiskt och individuellt per mus. Övervakningsplanerna bör inbegripa kriterier för omedelbar identifiering av möss som visar tecken på systemisk toxicitet, särskilt kraftig hudirritation eller hudkorrosion, så att de kan avlivas (36).

Kroppsvikt

29. Såsom konstateras i punkt 25 ska de individuella djurens vikt registreras vid försökets början och strax före den schemalagda avlivningen.

BERÄKNING AV RESULTATEN

30. Resultaten för varje behandlingsgrupp uttrycks som genomsnittet för stimulationsindex. Stimulationsindex erhålls genom att genomsnittligt värde för RLU/djur inom varje testämnesgrupp och den positiva kontrollgruppen divideras med genomsnittligt värde för RLU/djur för kontrollgruppen för lösningsmedel/vehikel. Genomsnittligt stimulationsindex för vehikelkontrollgrupperna är då 1.

▼M3

31. Vid bedömning av resultaten anses ett resultat vara positivt när SI ≥ 1,8 (10). Man kan dock även använda dos-responsförhållandets styrka samt den statistiska signifikansen och enhetligheten hos responsen i kontrollgruppen för lösningsmedel/vehikel och i den positiva kontrollen när man fastställer huruvida ett gränsresultat (dvs. SI-värde mellan 1,8 och 2,5) ska anses vara positivt 0 0 (37).

32. För ett gränsresultat för positiv respons där SI-värdet ligger mellan 1,8 och 2,5 vill man kanske beakta tilläggsinformation såsom dos-responsförhållandet, tecken på systemisk toxicitet eller särskilt kraftig irritation och, där det är lämpligt, statistisk signifikans tillsammans med SI-värden för att bekräfta att resultaten är positiva (10). Likaså bör man beakta testämnets olika egenskaper, inbegripet eventuell strukturell släktskap med kända hudsensibiliserande ämnen, huruvida ämnet orsakar särskilt kraftig hudirritation hos mössen samt naturen hos det iakttagna förhållandet mellan dos och respons. Dessa och andra aspekter diskuteras närmare i andra källor (4).

33. När data samlas in per enskild mus kan man göra en statistisk analys rörande förekomsten av dosrespons och graden för dos-responsförhållande. Alla statistiska analyser kan inbegripa en utvärdering av dos-responsförhållandet och en lämpligt anpassad jämförelse mellan testgrupper (t.ex. parvisa jämförelser mellan doseringsgrupp och parallell kontrollgrupp för lösningsmedel/vehikel). De statistiska analyserna kan inbegripa t.ex. linjär regression eller Williams test för utvärdering av dos-responstrender och Dunnetts test för parvisa jämförelser. Vid valet av en lämplig metod för den statistiska analysen bör man vara medveten om eventuella olikheter hos varianserna och andra relaterade problem som kan göra det nödvändigt att göra en datatransformation eller en icke-parametrisk statistisk analys. Det kan också vara nödvändigt att genomföra beräkningar av stimulationsindex och statistiska analyser med och utan vissa datapunkter (s.k. outliers – utanförliggande värden).

DATA OCH RAPPORTERING

Data

34. Data sammanställs i tabellform med angivelse av RLU-värden per djur, gruppens medelvärde för RLU per djur, den associerade feltermen (t.ex. SD, SEM) och medelvärdet för stimulationsindex för varje dosgrupp jämfört med den parallella kontrollgruppen för lösningsmedel/vehikel.

Testrapport

35. Testrapporten ska innehålla nedan angivna uppgifter.

Test- och kontrollkemikalier

— Identifieringsdata (t.ex. CAS-nummer och EG-nummer, om tillgängligt, källa, renhet, kända orenheter, satsnummer).

— Fysikalisk natur och fysikalisk-kemiska egenskaper (t.ex. flyktighet, stabilitet, löslighet).

— För blandningar anges sammansättning och beståndsdelarnas relativa procentandelar.

Lösningsmedel/vehikel

— Identifieringsdata (renhet, koncentration (om tillämpligt), volym som har använts).

— Motivering för val av vehikel.

▼**M3**

Testdjur

— CBA-mössens ursprung.

— Mikrobiologiska data för djuren, om dessa data är kända.

— Antal djur och deras ålder.

— Ursprung, inhysningsförhållanden, foder och dylikt.

Testbetingelser

— Ursprung, satsnummer och tillverkarens kvalitetsintyg/kvalitetskontrolldata för ATP-kit.

— Detaljerade uppgifter om beredning och applicering av testämnet.

— Motivering för valet av dos (även resultat från preliminär screening om sådan har genomförts).

— Koncentrationerna för vehikel och testämne samt totala mängden testämne som applicerats.

— Detaljerade uppgifter om foder- och vattenkvalitet (inbegripet diettyp/källa, vattenkälla).

— Detaljerad beskrivning av behandlings- och provtagningsscheman.

— Metoder för mätningar av toxicitet.

— Kriterier för att fastställa om resultatet är positivt eller negativt.

— Uppgifter rörande eventuella avvikelser från protokollet och redogörelse för hur avvikelsen påverkar undersökningens utformning och resultat.

Tillförlitlighetskontroll

— Sammanfattning av resultaten från senaste tillförlitlighetskontroll, även information om testämne, koncentration och vehikel.

— Data från parallella och/eller historiska positiva kontroller och parallella negativa kontroller (lösningsmedel/vehikel) för testningslaboratoriet.

— Om försöket inte har omfattat parallell positiv kontroll, ange datum och laboratorierapport för senaste periodiska positiva kontroll och en rapport med uppgifter om laboratoriets historiska data för positiva kontroller som motivering för varför parallell positiv kontroll inte har använts.

Resultat

— Mössens individuella vikt vid doseringsstart och vid schemalagd avlivning samt medelvärde och associerad felterm (t.ex. SD, SEM) för varje behandlingsgrupp.

— Tidpunkten för första upptäckt av tecken på toxicitet, även eventuell hudirritation vid appliceringsstället, för varje försöksdjur.

— Tidpunkten för avlivning och tidpunkten för ATP-mätning per djur.

— En tabell med RLU-värden och SI-värden per djur för varje dosbehandlingsgrupp.

— Medelvärde och associerad felterm (t.ex. SD, SEM) för RLU per mus för varje behandlingsgrupp och resultaten från analys av utanförliggande värden för varje behandlingsgrupp.

▼M3

— Beräknat stimulationsindex och ett lämpligt mått på variabilitet som beaktar variationen mellan djuren i testämnesgruppen och kontrollgruppen.

— Förhållandet mellan dos och respons.

— Statistisk analys, om tillämpligt.

Diskussion om resultaten

— En kort kommentar om resultaten, dos-responsanalys och statistiska analyser (i tillämpliga fall), med en slutsats om huruvida testämnet ska anses vara hudsensibiliserande.

HÄNVISNINGAR

(1) OECD (2010), *Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay*, Test Guideline No. 429, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris. Finns på: http://www.oecd.org/env/testguidelines

(2) Chamberlain, M. och 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. och 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. och 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. och 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. Finns på: 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. Finns på: 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. Finns på: http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/LLNAPRPRept2009.pdf.

(12) Idehara, K., Yamagishi, G., Yamashita, K. och 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. och 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. Finns på: 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. och 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. och 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. och 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. och 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. och 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. Finns på: http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNA-PerfStds.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. och 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. Finns på: http://www.oecd.org/env/testguidelines

▼M3

(26) Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L. och 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. Finns på: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf

(28) Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S. och 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. och 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. och 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. och 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. och Ahr, H.J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? *Arch. Toxicol*., 79, 721–728.

(34) Patterson, R.M., Noga, E. och 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. Finns på: 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. Finns på: 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. och 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. Finns på: http://www.oecd.org/env/testguidelines

▼M3

Tillägg 1

DEFINITIONER

Exakthet: Mått på hur väl testmetodresultaten och de godtagna referensvärdena överensstämmer med varandra. Exakthet är ett mått på testmetodens prestanda och en relevansaspekt. Detta begrepp används ofta omväxlande med ”konkordans” för att beskriva andelen korrekta resultat med en testmetod (38).

Referensämne: Sensibiliserande eller icke-sensibiliserande ämne som används som standard för jämförelse med ett testämne. Ett referensämne ska ha följande egenskaper: i) en eller flera enhetliga och tillförlitliga källor, ii) strukturell och funktionell likhet med den ämnesklass som testas, iii) kända fysikalisk-kemiska egenskaper, iv) stödjande data om kända effekter och v) känd styrka inom det önskade responsområdet.

Falsk negativt: Ett ämne som felaktigt har identifierats som negativt eller icke-aktivt genom en testmetod när ämnet i själva verket är positivt eller aktivt.

Falskt positivt: Ett ämne som felaktigt har identifierats som positivt eller aktivt genom en testmetod när ämnet i själva verket är negativt eller icke-aktivt.

Fara: Potentialen för skadliga verkningar på hälsa eller miljö. De skadliga verkningarna visar sig enbart om exponeringsnivån är tillräcklig.

Reproducerbarhet mellan laboratorier: Ett mått på i hur stor utsträckning olika kvalificerade laboratorier kan producera kvalitativt och kvantitativt liknande resultat, med användning av samma protokoll och samma testämnen. Reproducerbarheten mellan laboratorier fastställs under förvalideringen och valideringen och den indikerar i hur stor utsträckning ett test framgångsrikt kan överföras mellan laboratorier (38).

Reproducerbarhet inom laboratoriet: Ett mått på i vilken utsträckning kvalificerade personer inom samma laboratorium framgångsrikt kan upprepa resultat vid olika tidpunkter när de använder ett visst protokoll.

Utanförliggande värde: Ett utanförliggande värde (”outlier”) är en observation som markant skiljer sig från de övriga värdena i ett slumpmässigt urval från en population.

Kvalitetssäkring: En styrningsprocess där personer som är i oberoende ställning i förhållande till de personer som genomför testningen bedömer hur standarder, krav och registreringsförfaranden för laboratorietestning följs och hur exakt data förmedlas.

Tillförlitlighet: Ett mått på i vilken utsträckning en testmetod kan reproduceras inom och mellan laboratorier över tiden när metoden utförs med samma protokoll. Den bedöms genom att man beräknar reproducerbarheten inom och mellan laboratorier (38).

Hudsensibilisering: En immunologisk process som följer av att en mottaglig individ exponeras ytvägen för en inducerande kemisk allergen som provocerar en kutan immunrespons som kan leda till att det uppstår kontaktsensibilisering.

Stimulationsindex (SI): Ett värde som beräknas för att bedöma hudsensibiliseringspotentialen hos ett testämne och som är förhållandet mellan proliferationen i behandlingsgrupperna och proliferationen i den parallella vehikelkontrollgruppen.

Testämne (kallas också testkemikalie): Alla ämnen eller blandningar som testas med denna testmetod.

▼M3

B.51. **HUDSENSIBILISERING: LLNA-METODEN (LOCAL LYMPH NODE ASSAY): BrdU-ELISA**

INLEDNING

1. OECD:s riktlinjer för testning av kemikalier (OECD Guidelines for the Testing of Chemicals) och EU:s testmetoder ses regelbundet över med hänsyn till den vetenskapliga utvecklingen, nya lagstiftningsbehov och djurens välbefinnande. Den första testmetoden (B.42) för bestämning av hudsensibilisering hos möss (LLNA-metoden, OECD:s testriktlinje 429) har reviderats (1 och kapitel B.42 i denna bilaga). Närmare uppgifter om valideringen av LLNA och en översikt av arbetet i samband med denna har offentliggjorts (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9). I LLNA-metoden används radioisotopiskt tymidin eller jod för att mäta lymfocytproliferation och metoden har därför begränsad användning när det förekommer problem med att anskaffa, använda eller bortskaffa radioaktivitet. LLNA: BrdU-ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) är en icke-radioaktiv modifikation av LLNA-testmetoden och i den används icke-radiomärkt 5-bromo-2-deoxiuridin (BrdU) (CAS-nummer 59-14-3) i ett ELISA-baserat testsystem för mätning av lymfocytproliferation. LLNA: BrdU-ELISA har validerats, granskats och rekommenderats av en internationell oberoende expertutvärderingspanel som konstaterade att den kan användas för att identifiera hudsensibiliserande och icke-hudsensibiliserande kemikalier, med vissa begränsningar (10) (11) (12). Testmetoden är avsedd för bedömning av kemikaliers (ämnens och blandningars) potential att framkalla hudsensibilisering hos djur. Enligt kapitel B.6 i denna bilaga och i OECD:s testriktlinje 406 används test på marsvin, särskilt maximeringstest på marsvin och Buehler-test (13). LLNA (kapitel B.42 i denna bilaga; OECD:s testriktlinje 429) och de två icke-radioaktiva modifikationerna LLNA: BrdU-ELISA (kapitel B.51 i denna bilaga; OECD:s testriktlinje 442 B) och LLNA: DA (kapitel B.50 i denna bilaga; OECD:s testriktlinje 442 A) ger fördelar jämfört med marsvinstest enligt B.6 och OECD:s testriktlinje 406 (13) genom möjligheten att minska antalet djur och behandla dem på ett skonsammare sätt.

2. I likhet med LLNA används LLNA: BrdU-ELISA för att undersöka hudsensibiliseringens induktionsfas, vilket ger tillgång till kvantitativa data som är lämpliga för dos-responsbedömning. Vidare gäller att de här metodernas förmåga att upptäcka hudsensibiliserande kemikalier utan att det behövs radiomärkning för DNA eliminerar risken för yrkesmässig exponering för radioaktivitet och problem rörande bortskaffning av avfall. Detta kan i sin tur ge möjlighet till ökad användning av möss för att upptäcka hudsensibiliserande ämnen, vilket ytterligare kan minska användningen av marsvin för att testa kemikaliers hudsensibiliserande potential (dvs. B.6; OECD:s testriktlinje 406) (13).

DEFINITIONER

3. Definitioner av begreppen finns i tillägg 1.

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN OCH BEGRÄNSNINGAR

4. LLNA: BrdU-ELISA är en modifierad LLNA-metod för identifiering av kemikalier med potential att framkalla hudsensibilisering, med specifika begränsningar. Detta betyder dock inte nödvändigtvis att LLNA: BrdU-ELISA alltid ska användas i stället för LLNA eller test på marsvin (dvs. B.6; OECD:s testriktlinje 406) (13), utan att metoden är likvärdig och kan användas som ett alternativ i fall där positiva och negativa resultat i regel inte kräver någon ytterligare bekräftelse (10) (11). Testningslaboratoriet bör analysera all tillgänglig information om testämnet innan själva testningen genomförs. Sådan information inbegriper ämnets identitet och kemiska

▼M3

struktur, fysikalisk-kemiska egenskaper, resultaten från andra eventuella *in vitro*- eller *in vivo*-test avseende toxicitet samt toxikologiska data om strukturellt närbesläktade kemikalier. Denna information bör övervägas för att kunna fastställa om LLNA: BrdU-ELISA-metoden är lämplig för testämnet (mot bakgrund av att metoden inte kan användas för vissa typer av kemikalier, se punkt 5) och som stöd för valet av dos.

5. LLNA: BrdU-ELISA är en *in vivo*-metod, och därför kan man inte undvika användningen av djur för bedömning av sensibilisering genom allergisk kontakt. Metoden ger dock möjligheter att använda färre djur för detta ändamål i jämförelse med test på marsvin (B.6; OECD:s testriktlinje 406) (13). Dessutom ger LLNA: BrdU-ELISA möjlighet till en betydligt skonsammare behandling av djuren för testning av sensibilisering genom allergisk kontakt, eftersom man med LLNA: BrdU-ELISA, till skillnad från B.6 och OECD:s testriktlinje 406, inte behöver framkalla provokationsinducerade dermala hypersensitivitetsreaktioner. Dessutom behöver adjuvant inte användas, vilket är fallet vid maximeringstest på marsvin (kapitel B.6 i denna bilaga, 13). LLNA: BrdU-ELISA är därför en mindre plågsam metod för djuren. Trots fördelarna med LLNA: BrdU-ELISA i jämförelse med B.6 och OECD:s testriktlinje 406 (13) finns det vissa begränsningar som gör att man kanske måste använda B.6 eller OECD:s testriktlinje 406 (t.ex. testning av vissa metaller, falska positiva resultat med vissa hudirriterande ämnen (såsom vissa ytaktiva ämnen (6) (1 och kapitel B.42 i denna bilaga), testämnets löslighet)). Dessutom kan det för kemiska klasser eller ämnen som har funktionella grupper som påvisats agera som potentiella störfaktorer (15) vara nödvändigt att använda test på marsvin (dvs. B.6; OECD:s testriktlinje 406 (13)). Det rekommenderas att de begränsningar som anges för LLNA (1 och kapitel B.42 i denna bilaga) även ska gälla för LLNA: BrdU-ELISA (10). Utöver sådana identifierade begränsningar bör LLNA: BrdU-ELISA gå att använda för testning av alla kemikalier, utom om en kemikalie förknippas med egenskaper som kan påverka LLNA: BrdU-ELISA-metodens exakthet. Dessutom bör överväganden göras rörande möjligheten till positiva gränsresultat, när man erhåller värden för stimulationsindex mellan 1,6 och 1,9 (se punkterna 31–32). Detta grundar sig på valideringsdatabasen med 43 ämnen och användning av SI ≥ 1,6 (se punkt 6) för vilka LLNA: BrdU-ELISA ger korrekt identifiering av alla 32 sensibiliserande ämnen enligt LLNA men felaktig identifiering av 2 av 11 icke-sensibiliserande ämnen enligt LLNA med SI-värden mellan 1,6 och 1,9 (dvs. på gränsen till positivt) (10). Eftersom samma datauppsättning användes för att fastställa SI-värdena och beräkna testmetodens förutsägande egenskaper kan dock de angivna resultaten vara en överuppskattning av de faktiska förutsägande egenskaperna.

PRINCIP FÖR TESTMETODEN

6. LLNA: BrdU-ELISA bygger på principen om att sensibiliserande ämnen inducerar en primär proliferation av lymfocyter i de lymfnoder som dränerar det område där testämnet appliceras. Denna proliferation står i proportion till den applicerade dosen och det allergiframkallande ämnets styrka, och är ett enkelt sätt att få en kvantitativ mätning av sensibiliseringen. Proliferationen mäts genom att jämföra medelproliferationen i varje testgrupp med medelproliferationen i den vehikelbehandlade kontrollgruppen. Förhållandet mellan medelproliferationen i respektive behandlingsgrupp och den parallella vehikelkontrollgruppen, kallat stimulationsindex (SI), bestäms och detta bör vara ≥ 1,6 för att det ska vara motiverat att klassificera testämnet som potentiellt hudsensibiliserande ämne. De förfaranden som beskrivs här

▼M3

grundar sig på mätning av BrdU-innehållet för att indikera ett ökat antal prolifererande celler i de aurikulära dränerande lymfnoderna. BrdU är ett analogt ämne med tymidin och inkorporeras på liknande sätt in i DNA i prolifererande celler. Inkorporeringen av BrdU mäts med ELISA med hjälp av en antikropp som är specifik för BrdU som också märks med peroxidas. När substratet tillsätts reagerar peroxidas med detta och det uppstår en färgad produkt som kvantifieras vid en specifik absorbans genom avläsning av en mikrotiterplatta.

TESTBESKRIVNING

Val av djurart

7. För detta test används mus. Valideringsstudier för LLNA: BrdU-ELISA genomfördes uteslutande med stammen CBA/JN som därför anses vara den stam som är att föredra (10) (12). I testet används unga vuxna mushonor som inte har fött ungar och som inte är dräktiga. När försöket inleds bör djuren vara 8–12 veckor gamla. Djurens viktvariation bör vara minimal och får inte överskrida 20 % av medelvikten. Övriga stammar eller hanar kan användas som alternativ förutsatt att det finns tillräckliga data som stöd för att det inte förekommer några betydande stam- eller könsberoende skillnader i LLNA: BrdU-ELISA-respons.

Inhysnings- och utfodringsförhållanden

8. Mössen ska inhysas i grupper (16), utom om det finns tillbörlig vetenskaplig motivering för individuell inhysning. Temperaturen i testdjurens utrymmen bör vara 22 ± 3 °C. Den relativa fuktigheten bör vara minst 30 % och ska helst inte överstiga 70 %, utom när rummet rengörs. Målvärdet bör dock vara 50–60 %. Belysningen bör vara artificiell med omväxlande 12 timmar ljus och 12 timmar mörker. För utfodringen kan konventionellt laboratoriefoder användas, och djuren bör ha obegränsad tillgång till dricksvatten.

Förberedelse av djuren

9. Djuren väljs ut slumpmässigt och förses med märkning så att de kan identifieras individuellt (öronmärkning får dock inte användas). Därefter får djuren acklimatisera sig till laboratoriets förhållanden i sina burar i minst fem dagar före doseringsstart. Innan behandlingen inleds undersöks alla djur för att säkerställa att de inte har några synliga hudskador.

Förberedelse av doseringslösningar

10. Kemikalier i fast form ska upplösas eller suspenderas i lösningsmedel/vehikel och vid behov spädas ut före appliceringen på mössens öron. Kemikalier i vätskeform kan appliceras i ren eller utspädd form. Olösliga kemikalier, av den typ som ofta används i medicintekniska produkter, ska extraheras kraftigt i lämpligt lösningsmedel så att alla extraherbara beståndsdelar för testning fås ut. Testlösningarna ska beredas dagligen utom om stabilitetsdata visar att lagring kan accepteras.

Tillförlitlighetskontroll

11. Positiva kontrollkemikalier används för att påvisa att testsystemet har tillräcklig och reproducerbar känslighet för ett sensibiliserande testämne och en respons med välkarakteriserad styrka. Användningen av en parallell positiv kontroll rekommenderas eftersom den påvisar laboratoriets kompetens att genomföra testningar på ett framgångsrikt sätt och ger möjlighet till bedömning av reproducerbarhet och jämförbarhet inom laboratoriet och mellan laboratorier. Vissa tillsynsmyndigheter kräver också att positiv kontroll används för varje undersökning, och därför uppmuntras laboratorierna

▼M3

att samråda med relevanta myndigheter innan testning med LLNA: BrdU-ELISA inleds. Likaså uppmuntras rutinanvändning av parallell positiv kontroll för att undvika tilläggstestning på djur för att uppfylla krav som kan uppstå från användningen av periodisk positiv kontroll (se punkt 12). Den positiva kontrollen bör ge en positiv LLNA: BrdU-ELISA-respons på den exponeringsnivå som förväntas ge en ökning av stimulationsindex (SI) som är större eller lika med 1,6 i förhållande till negativa kontrollgruppen. Dosen av den positiva kontrollkemikalien ska väljas så att den inte orsakar särskilt kraftig hudirritation eller systemisk toxicitet och att induktionen är reproducerbar men inte för kraftig (t.ex. SI > 14 anses vara för högt värde). Rekommenderade ämnen för positiv kontroll är 25-procentig hexylkanelaldehyd (CAS-nummer 101-86-0) och 25-procentig eugenol (CAS-nummer 97-53-0) i aceton-olivoljeblandning i förhållandet 4:1 (volym/volym). I vissa fall kan även andra positiva kontrollkemikalier som uppfyller de ovan angivna kriterierna användas, förutsatt att tillbörlig motivering kan ges.

12. Även om användning av en parallell positiv kontrollgrupp rekommenderas kan det finnas betingelser där det är tillräckligt med periodisk testning (dvs. minst var sjätte månad) av den positiva kontrollen i laboratorier som regelbundet genomför LLNA: BrdU-ELISA (dvs. minst en gång i månaden) och som har en etablerad historisk databas över positiv kontroll som påvisar laboratoriets förmåga att få reproducerbara och exakta resultat från positiva kontroller. Tillräcklig kvalitet hos LLNA: BrdU-ELISA kan framgångsrikt påvisas genom att enhetliga positiva resultat erhålls från den positiva kontrollen vid minst tio oberoende testningar som genomförs inom en skälig tidsperiod (dvs. kortare än ett år).

13. Parallell positiv kontrollgrupp ska alltid användas när det sker ändringar rörande testningsförfarandet (t.ex. ny personal, nya material och/eller reagenser, annorlunda utrustning, byte av testdjurens ursprung), och sådana ändringar bör dokumenteras i laboratorierapporter. Man bör överväga om dessa ändringar påverkar den tidigare etablerade historiska databasens lämplighet, för att kunna avgöra om det behövs en ny historisk databas för dokumentering av den positiva kontrollens resultatenhetlighet.

14. Man bör vara medveten om att beslut om att använda positiva kontroller med vissa intervaller i stället för parallellt har återverkningar på lämpligheten och godtagbarheten hos negativa undersökningsresultat som fås utan parallell positiv kontroll under den tid som löper mellan de periodiska undersökningarna med positiv kontroll. Om man t.ex. får falska negativa resultat vid ett periodiskt test av positiv kontroll, måste man kanske ifrågasätta resultat som erhållits mellan det sista godtagbara periodiska testet med positiv kontroll och ett icke-godtagbart periodiskt test med positiv kontroll. Följderna av dessa utfall bör övervägas noggrant när man avgör huruvida parallella positiva kontroller ska användas eller om de positiva kontrollerna enbart ska vara periodiska. Likaså bör man överväga användning av färre djur i den parallella positiva kontrollgruppen när detta är vetenskapligt motiverat och laboratoriet med stöd av laboratoriespecifika historiska data kan påvisa att färre möss kan användas (17).

15. Även om det positiva kontrollämnet bör testas i en vehikel som veterligen framkallar en enhetlig respons (t.ex. aceton-olivoljeblandning i förhållandet 4:1 (volym/volym)), kan det förekomma vissa föreskriftsreglerade situationer där det även behövs testning i en icke-standardmässig vehikel (kliniskt och kemiskt relevant formulering) (18). Om det parallella positiva kontrollämnet testas i en annan vehikel än den som används för testämnet, bör en separat kontrollgrupp användas för den parallella positiva kontrollen.

▼M3

16. I fall där utvärdering görs av testämnen av en viss kemisk klass eller med en viss responsskala kan det också vara värdefullt med referensämnen för att påvisa att testmetoden fungerar tillfredsställande för bestämning av hudsensibiliseringspotentialen hos dessa typer av testämnen. Ett lämpligt referensämne ska ha följande egenskaper:

— Strukturell och funktionell likhet med den ämnesklass som testas.

— Kända fysikalisk-kemiska egenskaper.

— Stödjande data från LLNA: BrdU-ELISA.

— Stödjande data från andra djurmodeller och/eller från människor.

TESTFÖRFARANDE

Antalet djur och dosnivåer

17. Minst fyra djur per dosgrupp och minst tre koncentrationer av testämnet bör användas. Dessutom används en parallell negativ kontrollgrupp som endast behandlas med samma vehikel som används för testämnet och en grupp för positiv kontroll (parallell eller nyligen gjord, enligt laboratoriets principer för överväganden enligt punkterna 11–15). Man bör överväga flera upprepade doser av det positiva kontrollämnet, särskilt när den positiva kontrollen testas periodiskt. Med undantag för behandling med testämnet bör djuren i kontrollgrupperna hanteras på exakt samma sätt som djuren i dosgrupperna.

18. Doser och vehikel väljs på grundval av rekommendationerna i hänvisningarna 2 och 19. Doserna väljs i regel enligt en lämplig koncentrationsserie såsom 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 %, osv. Valet av koncentrationsserie ska ges tillbörlig vetenskaplig motivering. All existerande tillgänglig och relevant toxikologisk information (t.ex. akut toxicitet och hudirritation) samt strukturell och fysikalisk-kemisk information om testämnet (och/eller strukturellt besläktade ämnen) bör övervägas vid valet av de tre på varandra följande koncentrationerna så att den högsta koncentrationen ger maximal exponering samtidigt som systemisk toxicitet och särskilt kraftig lokal hudirritation undviks (19) (20 och kapitel B.4 i denna bilaga). Om sådan information inte finns kan det vara nödvändigt att först genomföra ett preliminärt screeningtest (se punkterna 21–24).

19. Vehikeln får inte störa eller snedvrida testresultaten och ska väljas med tanke på största möjliga löslighet för att få högsta möjliga koncentration samtidigt som man får en lösning/suspension som är lämplig för applicering av testämnet. Som vehikel rekommenderas aceton-olivoljeblandning (4:1 volym/volym), *N,N*-dimetylformamid, metyletylketon, propylenglykol och dimetylsulfoxid (6) men även andra vehiklar kan användas förutsatt att tillräcklig vetenskaplig motivering kan ges. I vissa situationer kan det vara nödvändigt att som extra kontroll använda ett kliniskt relevant lösningsmedel eller en kommersiellt tillgänglig blandning där testämnet ingår. Särskild vikt bör fästas vid att se till att hydrofila testämnen inkorporeras i ett vehikelsystem som väter huden och som inte omedelbart rinner bort, genom att använda lämpliga solubiliserande ämnen (t.ex. 1-procentig Pluronic® L92). Det betyder att helt vattenbaserade vehiklar bör undvikas.

▼M3

20. Genom analys av lymfnoder från individuella möss kan man bestämma variationer djuren emellan och göra en statistisk jämförelse av skillnaden mellan mätningar för testämnet och mätningarna i vehikelkontrollgruppen (se punkt 33). Dessutom kan möjligheten att minska antalet möss i den positiva kontrollgruppen endast övervägas utifrån att data samlas in individuellt per djur (17). Vidare gäller att vissa tillsynsmyndigheter kräver att data insamlas per individuellt djur. Regelbunden insamling av individuella data per djur ger en fördel rörande djurens välbefinnande eftersom upprepad testning undviks som annars skulle behövas om testämnesresultat som ursprungligen har samlats in på ett visst sätt (t.ex. genom poolade djurdata) måste granskas senare av tillsynsmyndigheter som har avvikande krav (såsom data per individuellt djur).

Preliminärt screeningtest

21. Om det inte finns tillgång till information för att bestämma högsta testdosen (se punkt 18) bör ett preliminärt screeningtest genomföras för att definiera den lämpliga dosnivån för test i LLNA: BrdU-ELISA. Syftet med det preliminära screeningtestet är att få vägledning för valet av högsta dosnivå i huvudundersökningen, i fall där information saknas om vilken koncentration som inducerar systemisk toxicitet (se punkt 24) och/eller särskilt kraftig lokal hudirritation (se punkt 23). Den högsta dosnivå som testas ska vara 100 % testämne för vätskor eller högsta möjliga koncentration för fasta ämnen eller suspensioner.

22. Det preliminära screeningtestet genomförs under identiska betingelser som vid den huvudsakliga LLNA: BrdU-ELISA-undersökningen, utom att man inte utvärderar proliferationen i lymfnoderna och man kan använda färre djur i dosgruppen. Ett eller två djur per dosgrupp föreslås. Alla möss observeras dagligen för kliniska tecken på systemisk toxicitet eller lokal irritation på appliceringsstället. Djurens kroppsvikt registreras före testningen och efter avslutad testning (dag 6). För varje mus observeras båda öronen för hudrodnad och graderas enligt tabell 1 (20 och kapitel B.4 i denna bilaga). Mätning av örontjocklek görs t.ex. med digital mikrometer eller Peacock Dial-instrument på dag 1 (före dosering), dag 3 (cirka 48 timmar efter den första dosen) och på dag 6. Dessutom kan örontjockleken bestämmas på dag 6 genom vägning av en öronbit som stansas ut efter skonsam avlivning. Särskilt kraftig lokal hudirritation indikeras genom hudrodnadsgradering ≥ 3 och/eller ökning av örontjockleken med ≥ 25 % på någon av mätningsdagarna (21) (22). Den högsta dos som väljs för huvudundersökningen blir nästa lägre dos i den preliminära screeningens koncentrationsserie (se punkt 18) som inte inducerar systemisk toxicitet och/eller särskilt kraftig hudirritation.

Tabell 1

Grader av hudrodnad

Observation	Gradering
Ingen hudrodnad	0
Mycket svag rodnad (knappt skönjbar)	1
Väldefinierad hudrodnad	2

▼M3

Observation	Gradering
Moderat till svår hudrodnad	3
Svår hudrodnad (köttrodnad) till sårskorpebildning som utgör hinder för gradering av rodnaden	4

23. För identifiering av irriterande ämnen med LLNA har man utöver en 25-procentig ökning av örontjocklek (21) (22) också använt statistiskt signifikant ökning av örontjockleken hos behandlingsgruppens möss i jämförelse med kontrollgruppens möss (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28). Dock så gäller att även om statistiskt signifikanta ökningar kan inträffa när ökningen av örontjocklek är mindre än 25 %, har dessa inte specifikt förknippats med särskilt kraftig irritation (25) (26) (27) (28) (29).

24. Följande kliniska observationer kan indikera systemisk toxicitet (30) när de används som del av en helhetsbedömning och kan således ge indikation om den högsta dosnivå som ska användas i huvudundersökningen: ändringar av nervsystemets funktion (t.ex. upprest päls, ataxi, skälvningar och konvulsioner), ändringar av beteende (t.ex. aggressivitet, ändringar av putsningsbeteende, markerad ändring av aktivitetsnivå), ändringar av andningsmönster (dvs. ändringar av andningens frekvens och intensitet, såsom dyspné, gäspande och rassel) samt ändringar av födo- och vattenintag. Vid utvärderingen ska man också beakta tecken på letargi och/eller avsaknad av reaktioner, alla slags kliniska tecken på mer än lätt eller momentan smärta eller lidande, minskning av kroppsvikten med mer än 5 % från dag 1 till dag 6 samt mortalitet. Döende djur och djur som visar tecken på svår smärta och lidande ska avlivas skonsamt (31).

Huvudundersökningens försöksschema

25. För testet används följande försöksschema:

— *Dag 1:* Djuren märks individuellt och vikten samt eventuella kliniska observationer registreras. Applicera 25 µl lämpligt utspätt testämne, ren vehikel eller positivt kontrollämne (parallell eller nyligen utförd positiv kontroll, i enlighet med laboratoriets principer när det gäller punkterna 11–15) på båda öronens baksida.

— *Dagarna 2 och 3:* Upprepa appliceringen enligt dag 1.

— *Dag 4:* Ingen behandling.

— *Dag 5:* Injicera 0,5 ml (5 mg/mus) BrdU-lösning (10 mg/ml) intraperitonealt.

— *Dag 6:* Registrera vikten för varje djur och eventuella kliniska observationer. Avliva djuren skonsamt cirka 24 timmar efter BrdU-injektionen. Skär bort de aurikulära dränerande lymfnoderna från varje musöra och behandla separat i fosfatbuffrad saltlösning (PBS) för varje djur. Närmare uppgifter och scheman för identifiering och dissekering av noder finns i hänvisning (17). För ytterligare kontroll av lokal hudrespons i huvudundersökningen kan tilläggsparametrar såsom gradering av örats hudrodnad eller mätningar av örats tjocklek (med tjockleksmätare eller genom vägning av utstansad bit vid obduceringen) införlivas i undersökningsprotokollet.

▼M3

Beredning av cellsuspensioner

26. För varje mus bereds en suspension med enskilda celler av lymfnodsceller (LNC) från de bilateralt bortskurna lymfnoderna genom försiktig mekanisk sönderdelning med hjälp av ett nät av rostfritt stål (200 mesh) eller annan godkänd teknik för beredning av en suspension med enskilda celler (t.ex. sönderdelning av lymfnoderna i en engångsmortel av plast åtföljt av passage genom ett nylonnät (70 mesh)). Förfarandet för beredning av LNC-suspensionen är kritiskt för detta test och därför bör varje laboratorium se till att färdigheterna övas in på förhand. Observera att lymfnoderna i den negativa kontrollgruppens djur är små, och det är viktigt att iaktta stor försiktighet för att undvika störande inverkan på SI-värdena. För varje fall ska målvolymen hos LNC-suspensionen justeras till en bestämd optimerad volym (cirka 15 ml). Den optimerade volymen baserar sig på att man för den negativa kontrollen ska få en genomsnittsabsorbans inom 0,1–0,2.

Bestämning av cellproliferation (mätning av BrdU-innehållet i lymfocyternas DNA)

27. BrdU mäts i ELISA med hjälp av ett kommersiellt tillgängligt kit (t.ex. Roche Applied Science, Mannheim, Tyskland, katalognummer 11 647 229 001). Mätningen går i huvuddrag ut på att 100 µl LNC-suspension överförs till brunnarna i en flatbottnad mikrotiterplatta i tre uppsättningar. Efter fixering och denaturering av LNC tillsätts anti-BrdU-antikropp till varje brunn och tillåts reagera. Därefter avlägsnas anti-BrdU-antikroppen genom tvättning och substratlösning tillsätts så att kromogen kan bildas. Därefter mäts absorbansen vid 370 nm med en referensvåglängd på 492 nm. Under alla omständigheter gäller att testningsbetingelserna bör optimeras (se punkt 26).

OBSERVATIONER

Kliniska observationer

28. Varje mus bör observeras minst dagligen med tanke på eventuella kliniska tecken – lokal irritation vid appliceringsstället eller tecken på systemisk toxicitet. Alla observationer registreras systematiskt och individuellt per mus. Övervakningsplanerna bör inbegripa kriterier för omedelbar identifiering av tecken på systemisk toxicitet, särskilt kraftig hudirritation eller hudkorrosion så att berörda djur kan avlivas (31).

Kroppsvikt

29. Enligt det som anges i punkt 25 ska de individuella djurens vikt registreras vid försökets början och strax före den schemalagda avlivningen.

BERÄKNING AV RESULTATEN

30. Resultaten för varje behandlingsgrupp uttrycks som genomsnittet för stimulationsindex. Stimulationsindex erhålls genom att genomsnittligt värde för BrdU-märkningsindex/djur inom varje testämnesgrupp och den positiva kontrollgruppen divideras med genomsnittligt värde för BrdU-märkningsindex för kontrollgruppen för lösningsmedel/vehikel. Det genomsnittliga stimulationsindexet för vehikelkontrollgrupperna har då värdet 1.

BrdU-märkningsindex definieras enligt följande:

$$\text{BrdU-märkningsindex} = (ABS_{em} - \text{ABS blank}_{em}) - (ABS_{ref} - \text{ABS blank}_{ref})$$

där em = emissionsvåglängd och ref = referensvåglängd.

▼M3

31. Vid bedömning av resultaten anses ett resultat vara positivt när SI ≥ 1,6 (10). Man kan dock även använda styrkan på dos-responsförhållandets samt den statistiska signifikansen och enhetligheten hos responsen i kontrollgruppen för lösningsmedel/vehikel och i den positiva kontrollen när man fastställer huruvida ett gränsresultat (dvs. SI-värde mellan 1,6 och 1,9) ska anses vara positivt (3) (6) (32).

32. För ett gränsresultat för positiv respons där SI-värdet ligger mellan 1,6 och 1,9 vill man kanske beakta tilläggsinformation såsom dos-responsförhållandet, tecken på systemisk toxicitet eller särskilt kraftig irritation och, där det är lämpligt, statistisk signifikans tillsammans med SI-värden för att bekräfta att resultaten är positiva (10). Likaså bör man beakta testämnets olika egenskaper, inbegripet eventuell strukturell släktskap med kända hudsensibiliserande ämnen, huruvida ämnet orsakar särskilt kraftig hudirritation hos mössen samt naturen hos det iakttagna förhållandet mellan dos och respons. Dessa och andra aspekter diskuteras närmare i andra källor (4).

33. När data samlas in per enskild mus kan man göra en statistisk analys rörande förekomsten av dosrespons och graden för dos-responsförhållande. Alla statistiska analyser kan inbegripa en utvärdering av dos-responsförhållandet och en lämpligt anpassad jämförelse mellan testgrupper (t.ex. parvisa jämförelser mellan doseringsgrupp och parallell kontrollgrupp för lösningsmedel/vehikel). De statistiska analyserna kan inbegripa t.ex. linjär regression eller Williams test för utvärdering av dos-responstrender och Dunnetts test för parvisa jämförelser. Vid valet av en lämplig metod för den statistiska analysen bör man vara medveten om eventuella olikheter hos varianserna och andra relaterade problem som kan göra det nödvändigt att göra en datatransformation eller en icke-parametrisk statistisk analys. Det kan också vara nödvändigt att genomföra beräkningar av stimulationsindex och statistiska analyser med och utan vissa datapunkter (s.k. outliers – utanförliggande värden).

DATA OCH RAPPORTERING

Data

34. Data sammanställs i tabellform med angivelse av värdena för BrdU-märkningsindex per djur, gruppens medelvärde för BrdU-märkningsindex per djur, den associerade feltermen (t.ex. SD, SEM) och medelvärdet för stimulationsindex för varje dosgrupp jämfört med den parallella kontrollgruppen för lösningsmedel/vehikel.

Testrapport

35. Testrapporten ska innehålla nedan angivna uppgifter.

Test- och kontrollkemikalier:

— Identifieringsdata (t.ex. CAS-nummer och EG-nummer, om tillgängligt, källa, renhet, kända orenheter, satsnummer).

— Fysikalisk natur och fysikalisk-kemiska egenskaper (t.ex. flyktighet, stabilitet, löslighet).

— För blandningar anges sammansättning och beståndsdelarnas relativa procentandelar.

Lösningsmedel/vehikel:

— Identifieringsdata (renhet, koncentration (om tillämpligt), volym som har använts).

— Motivering för val av vehikel.

▼**M3**

Testdjur:

— CBA-mössens ursprung.

— Mikrobiologiska data för djuren, om dessa data är kända.

— Antal djur och deras ålder.

— Ursprung, inhysningsförhållanden, foder och dylikt.

Testbetingelser:

— ELISA-satsens ursprung, satsnummer och kvalitetsförsäkran/kvalitetskontrolldata (antikroppskänslighet samt detektionsspecificitet och -gräns).

— Detaljerade uppgifter om beredning och applicering av testämnet.

— Motivering för valet av dos (även resultat från preliminär screening om sådan har genomförts).

— Koncentrationerna för vehikel och testämne samt totala mängden testämne som applicerats.

— Detaljerade uppgifter om foder- och vattenkvalitet (inbegripet diettyp/källa, vattenkälla).

— Detaljerad beskrivning av behandlings- och provtagningsscheman.

— Metoder för mätningar av toxicitet.

— Kriterier för att fastställa om resultatet är positivt eller negativt.

— Uppgifter rörande eventuella avvikelser från protokollet och redogörelse för hur avvikelsen påverkar undersökningens utformning och resultat.

Tillförlitlighetskontroll:

— Sammanfattning av resultaten från senaste tillförlitlighetskontroll, även information om testämne, koncentration och vehikel.

— Data från parallella och/eller historiska positiva kontroller och parallella negativa kontroller (lösningsmedel/vehikel) för testningslaboratoriet.

— Om försöket inte har omfattat parallell positiv kontroll, ange datum och laboratorierapport för senaste periodiska positiva kontroll och en rapport med uppgifter om laboratoriets historiska data för positiva kontroller som motivering för varför parallell positiv kontroll inte har använts.

Resultat:

— Mössens individuella vikt vid doseringsstart och vid schemalagd skonsam avlivning samt medelvärde och associerad felterm (t.ex. SD, SEM) för varje behandlingsgrupp.

— Tidpunkten för första upptäckt av tecken på toxicitet, även eventuell hudirritation vid appliceringsstället, för varje försöksdjur.

— En tabell med BrdU-märkningsindex per mus och SI-värden per behandlingsgrupp.

— Medelvärde och associerad felterm (t.ex. SD, SEM) för BrdU-märkningsindex per mus för varje behandlingsgrupp och resultaten från analys av utanförliggande värden för varje behandlingsgrupp.

▼M3

— Beräknat stimulationsindex och ett lämpligt mått på variabilitet som beaktar variationen mellan djuren i testämnesgruppen och kontrollgruppen.

— Förhållandet mellan dos och respons.

— Statistisk analys, om tillämpligt.

Diskussion om resultaten:

— En kort kommentar om resultaten, dos-responsanalys och statistiska analyser (i tillämpliga fall), med en slutsats om huruvida testämnet ska anses vara hudsensibiliserande.

HÄNVISNINGAR

(1) OECD (2010), Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay, Test Guideline No. 429, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris. Finns på: http://www.oecd.org/env/testguidelines

(2) Chamberlain, M. och 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. och 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. och 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. och 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. Finns på: 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. Finns på: 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. Finns på: http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/LLNAPRPRept2009.pdf

(12) Takeyoshi, M., Iida, K., Shiraishi, K. och 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. Finns på: 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. och 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. och 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. Finns på: http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNA-PerfStds.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. och 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. Finns på: http://www.oecd.org/env/testguidelines

(21) Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L. och 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. Finns på: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf.

(23) Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S. och 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. och 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. och 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. och 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. och 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. och Ahr, H.J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? Arch. Toxicol., 79, 721–728.

(29) Patterson, R.M., Noga, E. och 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. Finns på: 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. Finns på: 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. och 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. Finns på: http://www.oecd.org/env/testguidelines

▼M3

Tillägg 1

DEFINITIONER

Exakthet: Ett mått på hur väl testmetodresultaten och de godtagna referensvärdena överensstämmer med varandra. Exakthet är ett mått på testmetodens prestanda och en relevansaspekt. Detta begrepp används ofta omväxlande med ”konkordans” för att beskriva andelen korrekta resultat med en testmetod (33).

Referensämne: Ett sensibiliserande eller icke-sensibiliserande ämne som används som standard för jämförelse med ett testämne. Ett referensämne ska ha följande egenskaper: i) en eller flera enhetliga och tillförlitliga källor, ii) strukturell och funktionell likhet med den ämnesklass som testas, iii) kända fysikalisk-kemiska egenskaper, iv) stödjande data om kända effekter och v) känd styrka inom det önskade responsområdet.

Falsk negativt: Ett testämne som felaktigt har identifierats som negativt eller icke-aktivt genom en testmetod när ämne i själva verket är positivt eller aktivt (33).

Falskt positivt: Ett testämne som felaktigt har identifierats som positivt eller aktivt genom en testmetod när ämne i själva verket är negativt eller icke-aktivt (33).

Fara: Potentialen för skada på hälsa eller miljö. De skadliga verkningarna visar sig enbart om exponeringsnivån är tillräcklig.

Reproducerbarhet mellan laboratorier: Ett mått på i hur stor utsträckning olika kvalificerade laboratorier kan producera kvalitativt och kvantitativt liknande resultat, med användning av samma protokoll och samma testämne. Reproducerbarheten mellan laboratorier fastställs under förvalideringen och valideringen och den indikerar i hur stor utsträckning ett test framgångsrikt kan överföras mellan laboratorier (33).

Reproducerbarhet inom laboratoriet: Ett mått på i vilken utsträckning kvalificerade personer inom samma laboratorium framgångsrikt kan upprepa resultat vid olika tidpunkter när de använder ett visst protokoll (33).

Utanförliggande värde: Ett utanförliggande värde (”outlier”) är en observation som markant skiljer sig från de övriga värdena i ett slumpmässigt urval från en population.

Kvalitetssäkring: En styrningsprocess där personer som är i oberoende ställning i förhållande till de personer som genomför testningen bedömer hur standarder, krav och registreringsförfaranden för laboratorietestning följs och hur exakt data förmedlas.

Tillförlitlighet: Ett mått på i vilken utsträckning en testmetod kan reproduceras inom och mellan laboratorier över tiden när metoden utförs med samma protokoll. Den bedöms genom att man beräknar reproducerbarheten inom och mellan laboratorier (33).

Hudsensibilisering: En immunologisk process som följer av att en mottaglig individ exponeras ytvägen för en inducerande kemisk allergen som provocerar en kutan immunrespons som kan leda till att det uppstår kontaktsensibilisering.

Stimulationsindex (SI): Ett värde som beräknas för att bedöma hudsensibiliseringspotentialen hos ett testämne och som är förhållandet mellan proliferationen i behandlingsgrupperna och proliferationen i den parallella vehikelkontrollgruppen.

Testämne (kallas också testkemikalie): Alla ämnen eller blandningar som testas med denna testmetod.

▼M4

B.52 AKUT INHALATIONSTOXICITET – AKUT TOXICITETSKLASS

INLEDNING

1. Den här testmetoden motsvarar OECD:s testriktlinje (TG) 436 (2009). Den första testriktlinjen för akut inhalation 403 antogs 1981, och har sedan dess reviderats (se kapitel B.2 i denna bilaga (1)). Utvecklingen av en inhalationsmetod för akut toxicitetsklass (ATC) (2) (3) (4) ansågs lämplig efter antagandet av den reviderade orala ATC-metoden (kapitel B.1 i denna bilaga) (5). En retrospektiv resultatbedömning av ATC-testmetoden för akut toxicitet vid inhalation visade att metoden är lämplig för klassificerings- och märkningsändamål (6). ATC-testmetoden för inhalation medger användningen av seriella steg med fasta målkoncentrationer för att rangordna en testkemikalies toxicitet. Dödlighet används som viktigaste endpoint, dock, bör djur med svår smärta och som lider, eller är döende avlivas skonsamt för att minska lidandet. Vägledning om humana endpoints finns i OECD:s vägledningsdokument nr 19 (7).

2. I vägledningsdokumentet om akut inhalationstoxicitet (GD 39) (8) kan man få vägledning om den här beskrivna testmetodens genomförande och tolkning.

3. Definitioner som används inom ramen för den här testmetoden finns i tillägg 1 och i GD 39 (8).

4. Testmetoden ger information om farliga egenskaper och låter testkemikalien rangordnas och klassificeras i enlighet med förordning (EG) nr 1272/2008 om klassificering av kemikalier som orsakar akut toxicitet (9). Om punktskattningar av LC50-värden eller koncentration-responsanalyser krävs, är kapitel B.2 i denna bilaga (1) den lämpligaste testmetoden. Ytterligare vägledning om val av testmetod finns i GD 39 (8). Den här testmetoden är inte specifikt avsedd för testning av specialmaterial såsom svårlösliga isometriska eller fibrösa material, eller avsiktligt tillverkade nanomaterial.

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN

5. Innan man överväger ett test i enlighet med den här testmetoden bör testlaboratoriet överväga all information avseende testkemikalien, inklusive befintliga studier vars data visar att man inte behöver göra fler tester, för att minska användningen av djur. Information som kan underlätta val av lämplig art, stam, kön, exponeringssätt och lämplig testkoncentration är ämnets identitet och kemiska struktur, fysikalisk-kemiska egenskaper, resultat från andra eventuella in vitro- eller in vivo-studier avseende toxicitet; förväntad(e) användning(ar) och risken för mänsklig exponering, tillgängliga (Q)SAR-data samt toxikologiska data om strukturellt närbesläktade kemikalier. Koncentrationer som förväntas orsaka svår smärta eller lidande, beroende på frätande ([1]) eller allvarligt irriterande verkningar bör inte testas med denna testmetod (se GD 39 (8)).

([1]) Korrosivitetsbedömningen kan baseras på ett expertutlåtande på grundval av bevis såsom erfarenhet från människor eller djur, befintliga (in vitro) data, dvs. avsnitt B.40 (10), B.40 a (11) i denna bilaga eller OECD TG 435 (12), pH-värden, information från liknande kemikalier eller andra relevanta data.

▼M4

PRINCIP FÖR TESTMETODEN

6. Testprincipen bygger på ett stegvist förfarande som ger tillräcklig information om akut toxicitet vid inhalation av testkemikalien under en exponeringsperiod på 4 timmar för att möjliggöra dess klassificering. Andra exponeringstider kan gälla för specifika regulatoriska ändamål. För varje definierat koncentrationssteg ska 3 djur av vardera kön testas. Beroende på mortaliteten och/eller förekomsten av döende djur kan steg 2 vara tillräckligt för att möjliggöra bedömning av testkemikaliens akuta toxicitet. Om det saknas belägg för att det ena könet är mer mottagligt än det andra kan testet fortsätta med det mer mottagliga könet. Resultatet från det föregående steget kommer att bestämma det följande steget så att

a) ingen ytterligare testning behövs,

b) testning görs av tre djur per kön, eller

c) testning görs av 6 djur av det mer mottagliga könet dvs. den undre gränsen för uppskattningar av toxisk klass som bör baseras på 6 djur per testkoncentrationsgrupp, oberoende av kön.

7. Döende djur eller djur som visar tecken på uppenbar smärta eller svårt och ihållande lidande ska avlivas skonsamt och medtas i tolkningen av testresultaten på samma sätt som de som avled under testet. Kriterier för att ta beslutet att avliva döende eller svårt lidande djur, och vägledning om hur man känner igen tecknen på förutsägbar eller annalkande död, omfattas i vägledningsdokument nr 19 om humana endpoints (7).

METODBESKRIVNING

Val av djurart

8. I testet används friska unga vuxna djur av stammar som vanligtvis används på laboratorier. För detta test används råtta och motiveringar ska ges om andra arter används.

Förberedelse av djuren

9. Honorna ska inte ha fått ungar och inte vara dräktiga. På exponeringsdagen bör djuren vara unga vuxna 8 till 12 veckor gamla och kroppsvikten bör ligga inom ± 20 % av medelvikten för vardera könet för eventuellt tidigare exponerade djur i samma ålder. Djuren väljs ut slumpmässigt, förses med märkning så att de kan identifieras individuellt. Därefter får djuren acklimatisera sig till laboratoriets betingelser i sina burar i minst fem dagar före teststarten. Djuren bör också acklimatisera sig till testutrustningen en kort period före testet, eftersom detta minskar den stress som en ny miljö innebär.

Djurhållning

10. Temperaturen i försöksdjurens utrymmen bör vara 22 ± 3 °C. Den relativa fuktigheten bör ligga mellan 30 och 70 %, även om detta kanske inte är möjligt när vatten används som vehikel. Före och efter exponeringen bör djuren inhysas i grupper avhängigt kön och koncentration, dock får antalet djur per bur inte hindra en tydlig observation av varje enskilt djur, och förluster genom kannibalism och slagsmål bör minimeras. Om endast djurens nosar ska exponeras kan det vara nödvändigt att de får acklimatisera sig till fasthållningsrören. Fasthållningsrören ska inte medföra onödig fysisk, termisk eller fasthållningsstress för djuren. Fasthållning kan påverka fysiologiska endpoints såsom kroppstemperatur (hypotermi) och/eller minimala

▼M4

respiratoriska volymer. Om det finns generiska data tillgängliga som inte pekar på sådana förändringar i någon nämnvärd omfattning är det inte nödvändigt med anpassningen till rören före exponeringen. Djur vars hela kroppar ska exponeras för en aerosol ska inhysas individuellt under exponeringen för att förhindra att de andra djuren i buren filtrerar aerosolen genom sina pälsar. För utfodringen kan konventionellt laboratoriefoder användas, utom under exponeringen, tillsammans med en obegränsad tillgång till vatten. Belysningen bör vara artificiell med omväxlande 12 timmar ljus och 12 timmar mörker.

Inhalationskammare

11. Vid val av inhalationskammare bör man beakta kemikaliens beskaffenhet och testets ändamål. Det föredragna exponeringssättet är enbart nos (termen inkluderar även enbart huvud, enbart nos eller enbart tryne). Exponering av enbart nos föredras i allmänhet vid studier av vätskor och fasta aerosoler och ånga som kan kondenseras och bilda aerosoler. Vissa av undersökningens mål kan bättre uppnås genom exponering av hela kroppen, men detta ska motiveras i undersökningsrapporten. För att säkerställa atmosfärisk stabilitet vid användningen av en helkroppskammare ska den totala volymen av försöksdjuren inte överskrida 5 % av kammarens volym. Teknikerna för enbart nos och helkroppsexponeringen, deras principer och särskilda för- och nackdelar finns beskrivna i GD 39 (8).

EXPONERINGSBETINGELSER

Administrering av koncentrationer

12. En fast exponeringstid på 4 timmar, exklusive jämviktstid, rekommenderas. Andra varaktigheter kan behövas för att uppfylla specifika krav, dock bör motivering ges i studierapporten (se GD 39 (8)). Djur som exponeras i helkroppskammare ska inhysas individuellt för att hindra intagandet av testkemikalien på grund av skötsel av de andra djuren i buren. Inget foder ska ges under exponeringsperioden. Vatten kan tillhandahållas under en helkroppsexponering.

13. Djur exponeras för testkemikalien som en gas, ånga, aerosol eller en blandning av dem. Det fysikaliska tillstånd som ska testas beror på testkemikaliens fysikalisk-kemiska egenskaper, vald koncentration och/eller dess mest sannolika fysikaliska form vid hanteringen och användningen. Hygroskopiska och kemiskt reaktiva testkemikalier ska testas i torr luft. Det är viktigt att se till att inga explosiva koncentrationer skapas.

Partikelstorleksfördelning

14. Partikeldimensionering bör utföras för alla aerosoler och ångor som kan kondenseras och bilda aerosoler. För att möjliggöra exponering av alla relevanta områden i luftvägarna, rekommenderas aerosoler med en aerodynamisk diameter (MMAD) i intervallet 1 till 4 μm med en geometrisk standardavvikelse (σ_g) i intervallet 1,5 till 3,0 (8) (13) (14). Även om en rimlig ansträngning krävs för att uppfylla denna standard bör en sakkunnig bedömning göras om detta inte kan uppnås. Till exempel kan metalldimma understiga denna standard, och laddade partiklar, fibrer och hygroskopiska material (som ökar i storlek i den fuktiga miljön i andningsvägarna) kan överstiga denna standard.

▼M4

Beredning av testkemikalie i en vehikel

15. En vehikel kan användas för att generera en lämplig koncentration och partikelstorlek av testkemikalien i atmosfären. I regel bör vatten ha företräde. För att uppnå den erfordrade partikelstorleksfördelningen bör partikelmaterialet utsättas för mekaniska processer, emellertid bör försiktighet iakttas så att man inte sönderdelar eller förändrar testkemikalien. I de fall där mekaniska processer tros ha förändrat testkemikaliens sammansättning (t.ex. extrem temperatur från friktionen vid överdriven fräsning), bör testkemikaliens sammansättning verifieras analytiskt. Det är viktigt att testkemikalien inte förorenas. Det är inte nödvändigt att testa icke-spröda granulära material som avsiktligt är sammansatta så att de inte kan inhaleras. Ett friktionstest ska användas för att visa att inga inandningsbara partiklar bildas när det granulära materialet hanteras. Om ett friktionstest bildar inandningsbara partiklar ska ett test utföras avseende inhalationstoxicitet.

Kontrolldjur

16. Det är inte nödvändigt med en parallell negativ (luft-) kontrollgrupp. Om en annan vehikel än vatten används för att skapa testatmosfären ska en vehikelkontrollgrupp endast användas när historiska data om inhalationstoxicitet inte är tillgängliga. Om en toxicitetsstudie av en testkemikalie som har beretts i en vehikel inte påvisar någon toxicitet, framgår det att vehikeln är icke-toxisk vid den testade koncentrationen, och därmed finns det inget behov av en vehikelkontroll.

ÖVERVAKNING AV EXPONERINGSFÖRHÅLLANDEN

Kammarens luftflöde

17. Luftflödet genom kammaren ska omsorgsfullt kontrolleras, kontinuerligt övervakas och registreras minst en gång i timmen under varje exponering. Övervakningen av testatmosfärens koncentration (eller stabilitet) är en integrerad mätning av samtliga dynamiska parametrar och ett indirekt sätt att kontrollera alla relevanta atmosfärsskapande dynamiska parametrar. Särskild hänsyn bör tas för att undvika återandning i enbart nos-kammare i de fall där luftflödet genom exponeringssystemet är otillräckligt för att ge ett dynamiskt flöde i testkemikalieatmosfären. Det finns föreskrivna metoder som kan användas för att visa att återandning inte sker under de valda processförhållandena (8) (15). Syrehalten bör vara minst 19 % och koncentrationen av koldioxid bör inte överstiga 1 %. Om det finns anledning att tro att dessa standarder inte kan uppfyllas bör man mäta koncentrationen av syre och koldioxid.

Kammarens temperatur och relativa fuktighet

18. Kammarens temperatur bör upprätthållas vid 22 ± 3 °C. Relativ fuktighet i djurens andningsområden, gäller både enbart nos och helkroppsexponering, bör övervakas och registreras minst tre gånger under tidsperioder upp till 4 timmar, och varje timme vid kortare tidsperioder. Den relativa fuktigheten bör företrädesvis upprätthållas inom intervallet 30 till 70 %, men detta kanske inte är möjligt (t.ex. vid testning av vattenbaserade blandningar) eller inte mätbart på grund av att testkemikalien stör själva testmetoden.

▼M4

Testkemikalie: nominell koncentration

19. När det är möjligt bör den nominella koncentrationen i exponeringskammaren beräknas och registreras. Den nominella koncentrationen är massan av den genererade testkemikalien dividerad med den totala volymen av luft som passerade genom kammarsystemet. Den nominella koncentrationen används inte för att karakterisera djurens exponering, men en jämförelse mellan den nominella och den faktiska koncentrationen ger en indikation på testsystemets genereringseffektivitet, och kan därmed användas för att upptäcka genereringsproblem.

Testkemikalie: faktisk koncentration

20. Den faktiska koncentrationen är testkemikaliens koncentration i djurets andningsområde i en inhalationskammare. Faktiska koncentrationer kan erhållas antingen genom särskilda metoder (t.ex. direkt provtagning, adsorptiva eller kemiskt reaktiva metoder, och efterföljande analytisk karakterisering) eller av icke-specifika metoder såsom gravimetrisk filteranalys. Användningen av gravimetrisk analys är endast acceptabel för pulveraerosoler bestående av en enda komponent eller aerosoler bestående av vätskor med låg flyktighet, och bör stödjas av en lämplig preklinisk studie med kemikaliespecifik karakterisering. Koncentrationen i pulveraerosoler bestående av flera komponenter kan också bestämmas genom gravimetrisk analys. Detta kräver dock analysresultat som visar att sammansättningen av luftburet material liknar startmaterialet. Om denna information inte finns tillgänglig kan det vara nödvändigt med en ny analys av testkemikalien (helst i sitt luftburna tillstånd) under loppet av studien. För medel i aerosolform som kan förångas eller sublimeras bör man kunna visa att samtliga faser uppsamlades med den valda metoden. Målkoncentrationerna och de nominella och faktiska koncentrationerna ska finnas med i undersökningsrapporten, men endast de faktiska koncentrationerna används i de statistiska analyserna för att beräkna värdena för dödlig koncentration.

21. En sats av testkemikalien ska användas, om möjligt, och provet ska lagras under sådana förhållanden att det bibehåller sin renhet, homogenitet och stabilitet. Inför starten av studien bör det finnas en beskrivning av testkemikalien som inbegriper dess renhet och, om det är tekniskt genomförbart, identitet, och kvantiteterna av identifierade föroreningar och orenheter. Detta kan visas genom, men är inte begränsat till, följande data: retentionstid och relativ topparea, molekylvikt från masspektroskopi eller gaskromatografianalys, eller andra uppskattningar. Även om testlaboratoriet inte ansvarar för provets identitet kan det vara klokt att man i stora drag bekräftar karakteriseringen (t.ex. färg, fysisk natur etc.).

22. Exponeringsatmosfären ska hållas så konstant som möjligt och övervakas kontinuerligt och/eller intermittent beroende på analysmetoden. När intermittent provtagning används bör prover på kammaratmosfären tas minst två gånger under en fyratimmarsstudie. Om det inte är möjligt på grund av begränsade luftflöden eller låga koncentrationer, kan ett prov tas under hela exponeringsperioden. Om märkta prov-till-prov-fluktationer förekommer, bör man för de påföljande koncentrationerna som ska testas ta fyra prover per exponering. Provtagning av kammarkoncentrationer från individuella kammare bör inte avvika från den genomsnittliga koncentrationen med mer än ± 10 % för gaser och ångor, och inte med mer än ± 20 % för flytande eller fasta aerosoler. Tiden tills kammaren når jämvikt (t_{95}) bör beräknas och registreras. Varaktigheten för en exponering spänner sig över den tid som testkemikalien genereras och tar hänsyn till den tid som krävs för att uppnå t_{95}. Riktlinjer för att uppskatta t_{95} finns i GD 39 (8).

▼M4

23. För mycket komplexa blandningar bestående av ångor/gaser och aerosoler (t.ex. förbränningsatmosfärer och testkemikalier framdrivna från därför avsedd slutanvändningsprodukt/-utrustning). Varje fas kan bete sig annorlunda i en inhalationskammare så åtminstone en indikatorsubstans ska väljas (analyt), vanligtvis den huvudsakliga aktiva substansen i blandningen för varje fas (ånga/gas och aerosol). När testkemikalien är en blandning ska den analytiska koncentrationen i den totala blandningen rapporteras, inte bara för den aktiva ingrediensen eller komponenten (analyten). Ytterligare information om faktisk koncentration finns i GD 39 (8).

Testkemikalie: partikelstorleksfördelning

24. Aerosolers partikelstorleksfördelning bör fastställas minst två gånger under varje 4-timmarsexponering med hjälp av en kaskadimpaktor eller ett alternativt instrument såsom en aerodynamisk partikelsorterare. Om man kan visa ett likvärdigt resultat från en kaskadimpaktor eller det alternativa instrumentet, kan man använda det sistnämnda under hela försöket. En andra enhet, till exempel ett gravimetriskt filter eller en impinger/gasbubblare, bör användas parallellt med det primära instrumentet för att bekräfta uppsamlingsprestandan hos det primära instrumentet. Masskoncentrationen som erhållits genom analys av partikelstorleken ska ligga inom rimliga gränser för den masskoncentration som erhållits genom filteranalys (se GD 39 (8)). Om likvärdigheten kan påvisas i ett tidigt skede av försöket kan ytterligare bekräftande mätningar utelämnas. Av djurskyddsskäl bör åtgärder vidtas för att minimera ofullständiga uppgifter som kan leda till att exponeringen måste upprepas. Partikeldimensionering bör utföras för ångorna, om det finns en möjlighet att kondensen kan bilda en aerosol, eller om partiklar upptäcks i ångatmosfären som kan göra så att faserna blandas (se punkt 14).

PROCEDUR

Huvudtest

25. Tre djur per kön eller sex djur av det mer mottagliga könet används för varje steg. Om andra gnagare än råttor utsätts för enbart nos, kan de maximala exponeringstiderna justeras för att minska artspecifikt lidande. Koncentrationsnivån som ska användas som startdos väljs från en av fyra fasta nivåer, och nivån på utgångskoncentrationen bör vara den som mest sannolikt producerar toxicitet hos vissa av de doserade djuren. Testprogrammet för gaser, ångor och aerosoler (inkluderad i tilläggen 2–4) representerar testningen med avslutningsvärdena för CLP-kategorierna 1–4 (9) för gaser (100, 500, 2 500, 20 000 ppm/4h) (tillägg 2), för ångor (0,5, 2, 10, 20 mg/l/4h) (tillägg 3) och för aerosoler (0,05, 0,5, 1, 5 mg/l/4h) (tillägg 4). Kategori 5, som inte är genomförd i förordning (EG) nr 1272/2008 (9) avser koncentrationer över respektive gränskoncentration. För varje startkoncentration gäller respektive testprogram. Beroende på antalet humant avlivade eller döda djur följer testproceduren de angivna pilarna tills en kategorisering kan göras.

26. Tidsintervallet mellan exponeringsgrupperna fastställs genom start, varaktighet och allvarlighetsgrad för tecknen på toxicitet. Exponering av djur vid nästa koncentrationsnivå ska fördröjas tills det finns rimlig anledning att anta att de tidigare testade djuren överlever. En period på tre eller fyra dagar mellan exponeringarna för varje koncentrationsnivå rekommenderas för observationen av fördröjd toxicitet. Tidsintervallet kan anpassas på lämpligt sätt, t.ex. i händelse av ofullständiga responser.

▼M4

Toleranstest

27. Toleranstestet används när testkemikalien är känd eller förväntas vara praktiskt taget icke-toxisk dvs. framkallar endast en toxisk reaktion över den reglerade gränskoncentrationen. Information om testkemikaliens toxicitet kan erhållas genom kunskap om liknande testade substanser eller liknande blandningar, med beaktande av identitet och procentandel av komponenter kända för att ha en signifikant toxicitet. I situationer när det finns lite eller ingen information om dess toxicitet, eller testkemikalien förväntas vara toxisk, ska huvudtestet utföras (ytterligare vägledning finns i GD 39 (8)).

28. Enligt det normala förfarandet exponeras tre djur per kön, eller sex djur av det mer mottagliga könet för en koncentration av respektive 20 000 ppm för gaser, 20 mg/l för ångor och 5 mg/l för damm/ånga (om möjligt), vilket fungerar som toleranstestet för denna testmetod. När man testar aerosoler bör det primära målet vara att uppnå en andningsbar partikelstorlek (dvs. en MMAD på 1–4 μm). Det är möjligt för de flesta kemikalier med en koncentration på 2 mg/l. Testning av aerosoler med högre än 2 mg/l ska endast göras om en andningsbar partikelstorlek kan uppnås [se GD 39 (8)]. I enlighet med GHS (16), avrådes testning över en gränskoncentration på grund av djurskyddsskäl. Testning i GHS-kategori 5 (16), som inte är genomförd i förordning (EG) nr 1272/2008 (9), ska endast övervägas om det finns en stor sannolikhet för att resultaten från ett sådant test har en direkt relevans för skydd av människors hälsa, och motivering lämnas i studierapporten. När det gäller potentiellt explosiva testkemikalier bör man vara noga med att undvika förhållanden som är gynnsamma för en explosion. För att undvika onödig användning av djur ska ett test genomföras utan djur före toleranstestet, för att se till att förhållandena i kammaren kan uppnås för ett toleranstest.

OBSERVATIONER

29. Djuren bör ofta observeras kliniskt under exponeringsperioden. Efter exponeringen ska kliniska observationer göras minst två gånger på dagen för exponeringen, eller oftare om djurens respons på behandlingen indikerar det, och därefter minst en gång per dag under en period av 14 dagar. Observationstidens längd är inte fast, utan bör bestämmas utifrån art och tidpunkt för de första kliniska tecknen samt längden på återhämtningsperioden. De tillfällen då tecken på toxicitet uppträder och försvinner är viktig, särskilt om tecknen på toxicitet visar en tendens att fördröjas. Alla observationer registreras systematiskt med individuella registreringar för varje djur. Djur som påträffas döende och djur som visar tecken på uppenbar smärta och/eller svårt ihållande lidande ska avlivas skonsamt av djurskyddsskäl. Försiktighet bör iakttas vid utförande av undersökningar för kliniska tecken på toxicitet med djur som ser dåliga ut och har övergående respiratoriska förändringar till följd av exponeringsförfarandet, inte misstas för behandlingsrelaterade verkningar. Principerna och kriterierna som finns sammanfattade i vägledningsdokumentet om humana endpoints bör tas i beaktande (7). När djur avlivas av humanitära skäl eller påträffas döda, ska tidpunkten för dödsfallet registreras så noggrant som möjligt.

▼M4

30. Observationer vid buren bör omfatta förändringar i bur och päls, ögon och slemhinnor, samt även andningsorganen, cirkulationsorganen och det autonoma och centrala nervsystemet, samt kroppsmotorik och beteendemönster. Om möjligt bör eventuella skillnader mellan lokala och systematiska effekter noteras. Uppmärksamhet bör fästas vid observationer av tremor, konvulsioner, salivutsöndring, diarré, letargi, sömn och koma. Mätningen av rektala temperaturer kan ge belägg för bradypnéreflex eller hypo/hypertermi relaterat till behandling eller inspärrning.

Kroppsvikt

31. Vikten hos individuella djur bör registreras en gång under acklimatiseringsperioden på exponeringsdagen innan exponeringen (dag 0), och åtminstone dag 1, 3 och 7 (och därefter varje vecka), och vid tidpunkten för när döden eller avlivningen inträffar om dag 1 överskrids. Kroppsvikt är en erkänt viktig indikator för toxicitet och djur som uppvisar en ihållande minskning på ≥ 20 % jämfört med värden från förstudien bör noggrant övervakas. Djur som överlever vägs och avlivas skonsamt i slutet av perioden efter exponeringsperioden.

Patologi

32. Alla försöksdjur, inklusive de som avlider under testet eller avlivas och tas bort från undersökningen av djurskyddsskäl bör obduceras. Om en obduktion inte kan utföras omedelbart efter att ett dött djur har upptäckts, bör djuret kylas (inte frysas) vid en temperatur som är tillräckligt låg för att minimera autolys. Obduktioner ska utföras så snart som möjligt, vanligtvis inom en dag eller två. Alla betydande patologiska förändringar bör registreras för varje djur med särskild uppmärksamhet på eventuella förändringar i luftvägarna.

33. Ytterligare undersökningar inklusive a priori genom beräkning kan anses utöka studiens tolkningsvärde, såsom mätning av lungvikt hos överlevande råttor, och/eller ge prov på irritation genom mikroskopundersökningen av luftvägarna. Undersökta organ kan innefatta sådana som uppvisar betydande skador och som härrör från djur som överlevt 24 timmar eller mer, och organ kända för, eller som förväntas påverkas. Mikroskopisk undersökning av hela luftvägarna kan ge användbar information om testkemikalier som är reaktiva med vatten, såsom syror och hygroskopiska testkemikalier.

DATA OCH RAPPORTERING

Data

34. Individuella data om kroppsvikt och obduktionsfynd bör tillhandahållas. Kliniska observationsdata bör sammanfattas i tabellform, som för varje testgrupp visar antalet djur som använts, antalet djur som visar tecken på toxicitet, antalet djur som avlidit under testet eller som avlivats av humanitära skäl, tidpunkten då det enskilda djuret har avlidit, beskrivning och tidsförlopp för toxiska verkningar och reversibilitet, samt obduktionsfynd.

▼M4

Testrapport

35. Testrapporten ska omfatta följande information, när så är lämpligt:

Försöksdjur och djurhållning

— Beskrivning av burförhållanden, inklusive antal (eller förändring av antal) djur per bur, strö, omgivningstemperatur och relativ fuktighet, ljusperiod och identifiering av kost.

— Art/stam som används och motivering för användning av andra arter än råtta.

— Djurens antal, ålder och kön.

— Metod för randomisering.

— Uppgifter om foder- och vattenkvalitet (inbegripet kosttyp/-källa och vattenförsörjning).

— Beskrivning av eventuella förtestbetingelser inbegripet kost, karantän och behandling av sjukdomar.

Testkemikalie

— Fysikalisk natur, renhet och, i förekommande fall, fysikalisk-kemiska egenskaper (inbegripet isomerisering).

— Identifieringsdata och CAS-nummer (Chemical Abstract Services), om detta är känt.

Vehikel

— Motivering för användning av vehikel och valet av vehikel (om annat än vatten).

— Historiska eller parallella data som visar att vehikeln inte påverkar studiens slutresultat.

Inhalationskammare

— Beskrivning av inhalationskammaren inklusive mått och volym.

— Ursprung och beskrivning av utrustning som används för exponering av djur så väl som generering av atmosfär.

— Utrustning för mätning av temperatur, fuktighet, partikelstorlek och faktisk koncentration.

— Luftkälla, behandling av luft som tillförs/extraheras och system som används för luftkonditionering.

— Metoder som används för kalibrering av utrustning för att säkerställa en homogen testatmosfär.

— Tryckskillnad (positiv eller negativ).

— Exponeringsportar per kammare (enbart nos), placering av djur i systemet (helkropp).

— Temporal homogenitet/stabilitet för testatmosfären.

— Placering av temperatur- och fuktighetsgivare och provtagning av testatmosfären i kammaren.

— Luftflödeshastigheter, port för luftflöde och exponering (enbart nos), eller djurbelastning och kammare (helkropp).

— Information om utrustningen som används för att mäta syre och koldioxid, i förekommande fall.

▼M4

— Tid som krävs för att uppnå jämvikt i inhalationskammaren (t_{95}).

— Antal volymutbyten per timme.

— Mätutrustning (i förekommande fall).

Exponeringsdata

— Grunden för valet av målkoncentration i huvudstudien.

— Nominella koncentrationer (den totala massan av testkemikalien som genereras i inhalationskammaren dividerad med luftvolymen som passerar genom kammaren).

— Faktiska koncentrationer av testblandningar som insamlats från djurens andningsapparat, för blandningar som bildar heterogena fysikaliska former (gaser, ångor, aerosoler), där var och en kan analyseras separat.

— Alla luftkoncentrationer ska rapporteras i viktenheter (t.ex. mg/l, mg/m^3, etc.), enheter för volym (t.ex. ppm, ppb) kan också redovisas inom parantes.

— Partikelstorleksfördelning, aerodynamisk massmediandiameter (MMAD) och geometrisk standardavvikelse (σ_g), inklusive metoderna för deras beräkning. Individuella partikelstorleksanalyser bör rapporteras.

Testbetingelser

— Uppgifter om testkemikalieberedning, inklusive uppgifter om eventuella procedurer som använts för att minska partikelstorleken hos fasta substanser eller för att bereda testlösningar. I de fall där mekaniska processer kan ha förändrat testkemikaliens sammansättning ska analysresultaten inkluderas för att bekräfta dess sammansättning.

— En beskrivning (helst med ett diagram) av utrustningen som används för att generera testatmosfären och exponera djuren för denna atmosfär.

— Uppgifter om den kemiska analysmetod som använts och metodvalidering (inklusive effektiviteten för återvinningen av testkemikalien från provtagningsmediet).

— Grunden för valet av testkoncentration.

Resultat

— Tabelluppställning av kammarens temperatur, fuktighet och luftflöde.

— Tabelluppställning av kammarens nominella och faktiska koncentrationsdata.

— Tabelluppställning av partikelstorleksdata som omfattar provtagningsdata, partikelstorleksfördelning och beräkning av MMAD och σ_g.

— Tabelluppställning av responsdata och koncentrationsnivåer för varje djur (dvs. djur som uppvisar tecken på toxicitet inklusive mortalitet, natur, allvarlighetsgrad och effekternas varaktighet).

— Den individuella kroppsvikten hos djuren som samlats in på studiedagar, datum och tid för dödsfall som inträffat före planerad avlivning, tidsförlopp för första tecken på toxicitet och om dessa var reversibla för varje enskilt djur.

▼M4

— Obduktionsfynd och histopatologiska fynd för varje djur, om detta finns tillgängligt.

— CLP-kategoriklassificering och LC_{50}-avslutningsvärde;

Diskussion och tolkning av resultaten

— Särskild uppmärksamhet bör ges till beskrivningen av använda metoder för att uppfylla kriterierna för den här testmetoden, t.ex. koncentrationsgräns eller partikelstorlek.

— Partiklarnas andningsbarhet i ljuset av de övergripande resultaten bör åtgärdas, särskilt om kriterierna för partikelstorlek inte kunde uppfyllas.

— Överensstämmelsen mellan metoderna som används för att bestämma nominell och faktisk koncentration, och förhållandet mellan faktisk och nominell koncentration bör ingå i den samlade bedömningen av studien.

— Den sannolika dödsorsaken och dominerande verkningsmekanism (systematisk mot lokal) bör behandlas.

— En förklaring bör ges om det fanns behov av att offra djur, som visade tecken på uppenbar smärta eller svårt och ihållande lidande, av humanitära skäl på grundval av kriterierna i OECD:s vägledningsdokument om humana endpoints (7).

LITTERATUR

(1) Kapitel B.2 i denna bilaga, akut toxicitet (inhalation).

(2) Holzhütter H-G, Genschow E, Diener W, and Schlede E (2003). Dermal and Inhalation Acute Toxicity Class Methods: Test Procedures and Biometric Evaluations for the Globally Harmonized Classification System. *Arch. Toxicol.* 77: 243–254.

(3) Diener W, Kayser D and Schlede E (1997). The Inhalation Acute-Toxic-Class Method; Test Procedures and Biometric Evaluations. *Arch. Toxicol.* 71: 537–549.

(4) Diener W and Schlede E (1999). Acute Toxic Class Methods: Alternatives to LD/LC_{50} Tests. *ALTEX* 1: 129–134.

(5) Chapter B.1 i denna bilaga, akut inhalationstoxicitet - metod för akut toxciciteskласс (ATC).

(6) OECD (2009). Report on Biostatistical Performance Assessment of the Draft TG 436 Acute Toxic Class Testing Method for Acute Inhalation Toxicity. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 105, OECD, Paris. Finns 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. Finns 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. Finns på [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(9) Europaparlamentets och rådets förordning (EG) nr 1272/2008 av den 16 december 2008 om klassificering, märkning och förpackning av ämnen och blandningar, ändring och upphävande av direktiven 67/548/EEG och 1999/45/EG samt ändring av förordning (EG) nr 1907/2006 (EUT L 353, 31.12.2008, s. 1).

▼M4

(10) Kapitel B.40 i denna bilaga, in vitro-test av hudkorrosivitet: bestämning av transkutant elektriskt motstånd (TER).

(11) Kapitel B.40 a i denna bilaga, in vitro-test av hudkorrosivitet: test med modell av human hud.

(12) OECD (2005). In Vitro Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion. OECD Guideline for testing of chemicals No. 435, OECD, Paris. Finns 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 and Thiel A (2007). A Simple Approach to Validation of Directed-Flow Nose-Only Inhalation Chambers. J. Appl. Toxicol.27: 160–167.

(16) UN (2007), United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), ST/SG/AC.10/30, UN New York and Geneva. Finns på [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_welcome_e.html]

▼**M4**

Tillägg 1

DEFINITION

Testkemikalie: Alla ämnen eller blandningar som testas med denna testmetod.

▼M4

Tillägg 2

Förfarande för varje startkoncentration för gaser (ppm/4 h)

Allmänna anmärkningar ([1])

För varje startkoncentration ska förfarandet som är beskrivet i detta tillägg följas för respektive testprogram.

Tillägg 2 a: Startkoncentration är 100 ppm

Tillägg 2 b: Startkoncentration är 500 ppm

Tillägg 2 c: Startkoncentration är 2 500 ppm

Tillägg 2 d: Startkoncentration är 20 000 ppm

Beroende på antalet humant avlivade eller döda djur ska testproceduren följa de angivna pilarna.

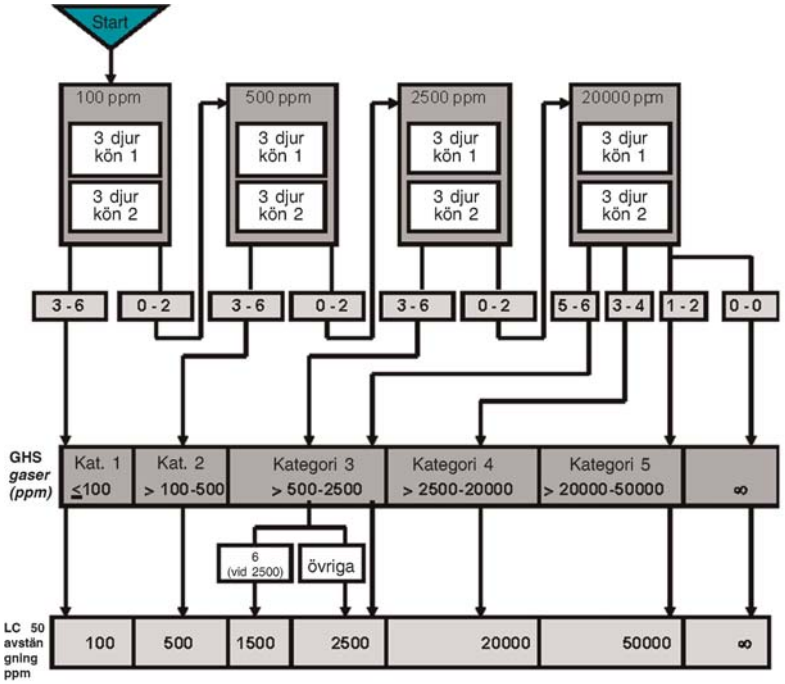
([1]) I följande tabeller refereras till GHS (Globally Harmonised System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). EU-motsvarigheten är förordning (EG) nr 1272/2008. När det gäller akut inhalationstoxicitet, tillämpar inte förordning (EG) nr 1272/2008 (9) kategori 5.

▼M4

Tillägg 2a

Akut inhalations toxicitet:

Tes tförfarande med en s tartkoncentration av 100 ppm/4 h för gas er



— 3 ♂ + 3 ♀, eller 6 djur av det mer mottagliga könet per steg

— 0-6: Antal döende eller döda djur/testad koncentration

— GHS: Globally Harmonized Classification System

— ∞: oklassifierad

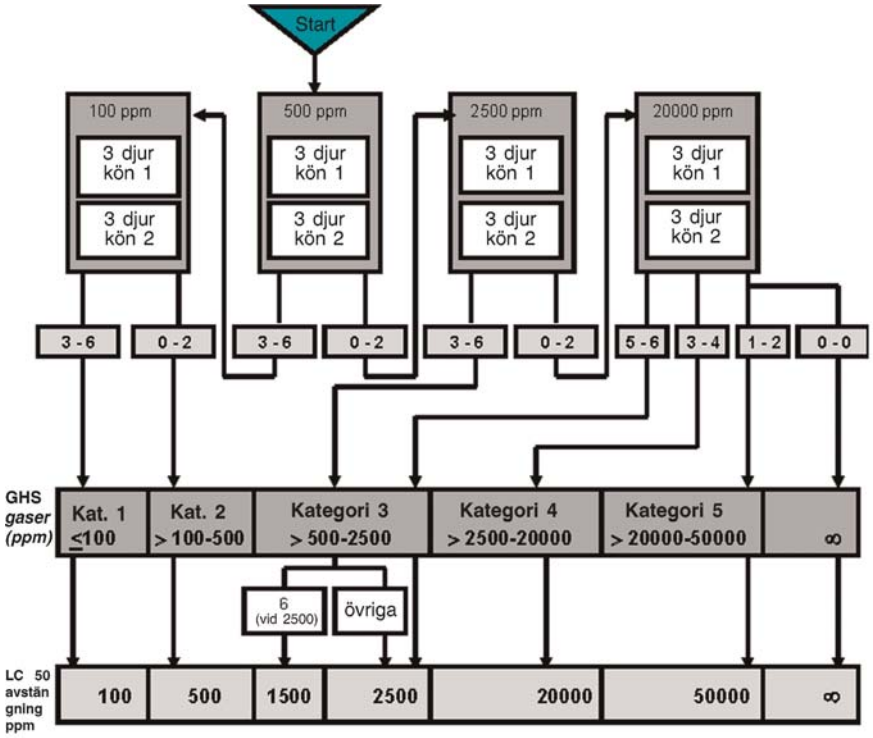
— Testning vid ≥ 20000 ppm/4h: se vägledningsdokument 39 (8)

▼M4

Tillägg 2b

Akut inhalationstoxicitet:

Testförfarande med en startkoncentration av 500 ppm/4 h för gaser



— 3 ♂ + 3 ♀, eller 6 djur av det mer mottagliga könet per steg

— 0-6: Antal döende eller döda djur/testad koncentration

— GHS: Globally Harmonized Classification System

— ∞: oklassifierad

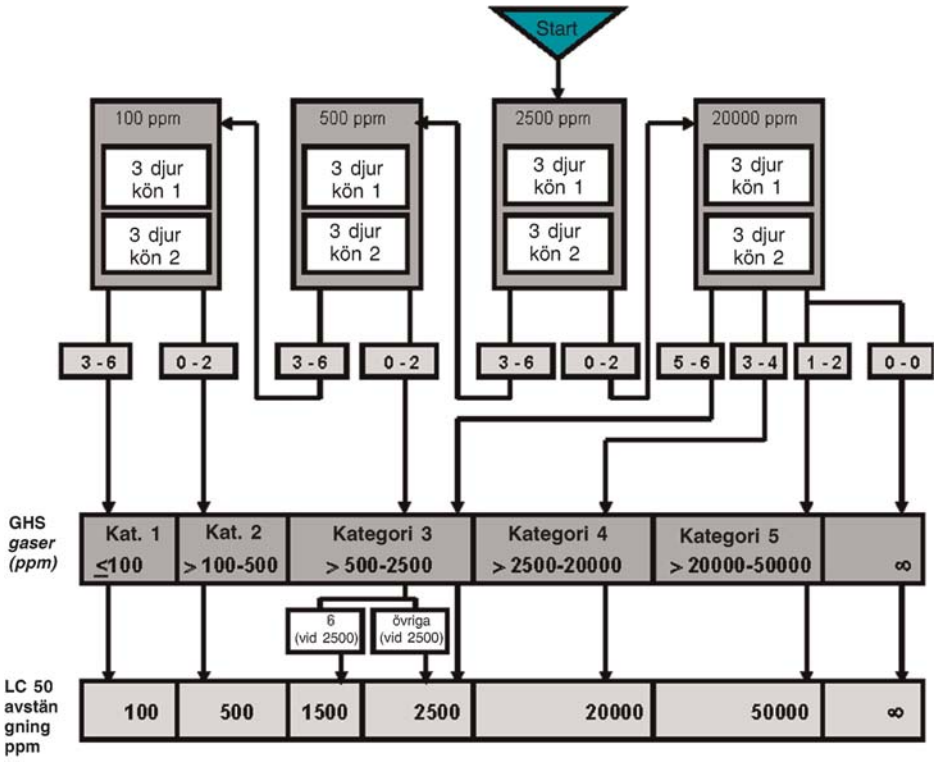
— Testning vid ≥ 20000 ppm/4h: se vägledningsdokument 39 (8)

▼M4

Tillägg 2c

Akut inhalationstoxicitet:

Testförfarande med en startkoncentration av 2 500 ppm/4 h för gaser



— 3 ♂ + 3 ♀, eller 6 djur av det mer mottagliga könet används per steg

— 0–6: Antal döende eller döda djur/testad koncentration

— GHS: Globally Harmonized Classification System

— ∞: oklassifierad

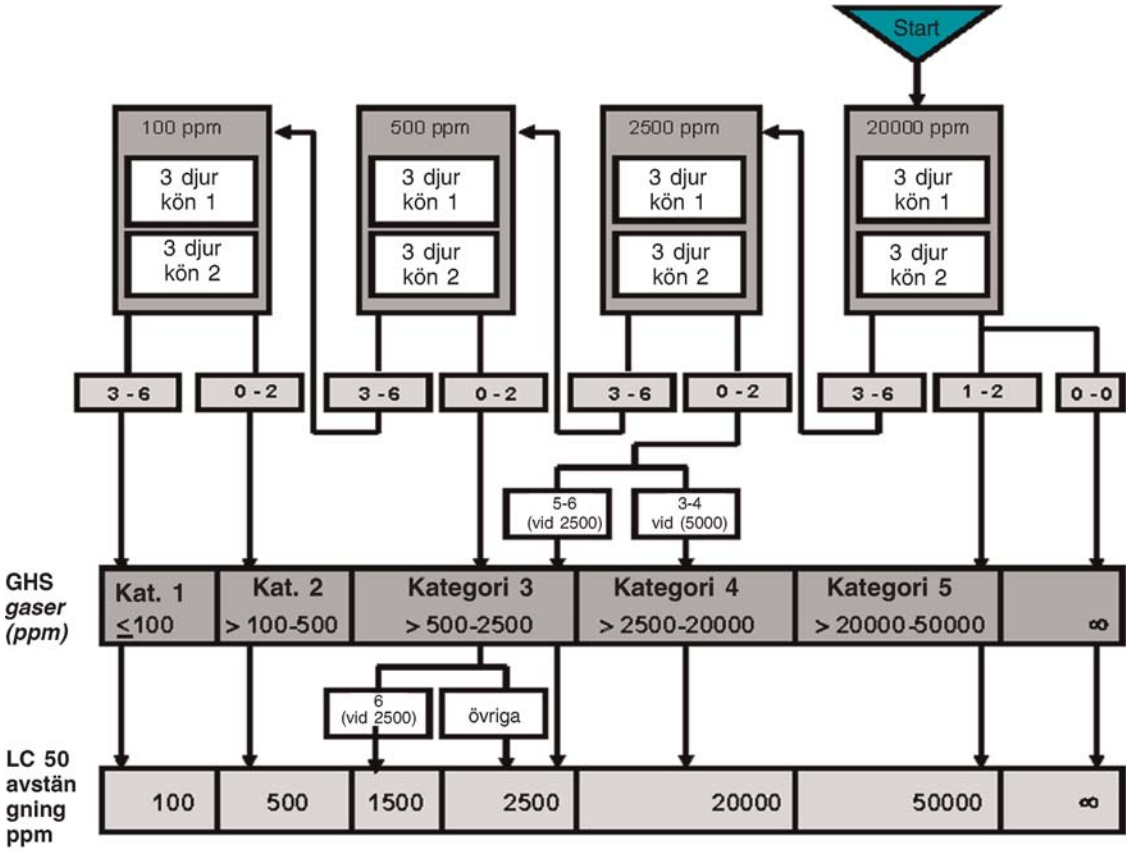
— Testning vid ≥ 20000 ppm/4h: se vägledningsdokument 39 (8)

▼M4

Tillägg 2d

Akut inhalationstoxicitet:

Testförfarande med en startkoncentration av 20 000 ppm/4 h för gaser



— 3 ♂ + 3 ♀, eller 6 djur av det mer mottagliga könet används per steg

— 0-6: antal döende eller döda djur/testad koncentration

— GHS: Globally Harmonized Classification System

— ∞: oklassifierad

— Testning vid ≥ 20000 ppm/4h: se vägledningsdokument 39 (8)

▼M4

Tillägg 3

Förfarande för varje startkoncentration för ångor (mg/l/4 h)

Allmänna anmärkningar ([1])

För varje startkoncentration ska förfarandet som är beskrivet i detta tillägg följas för respektive testprogram.

Tillägg 3 a: Startkoncentration är 0,5 mg/l

Tillägg 3 b: Startkoncentration är 2,0 mg/l

Tillägg 3 c: Startkoncentration är 10 mg/l

Tillägg 3 d: Startkoncentration är 20 mg/l

Beroende på antalet humant avlivade eller döda djur ska testproceduren följa de angivna pilarna.

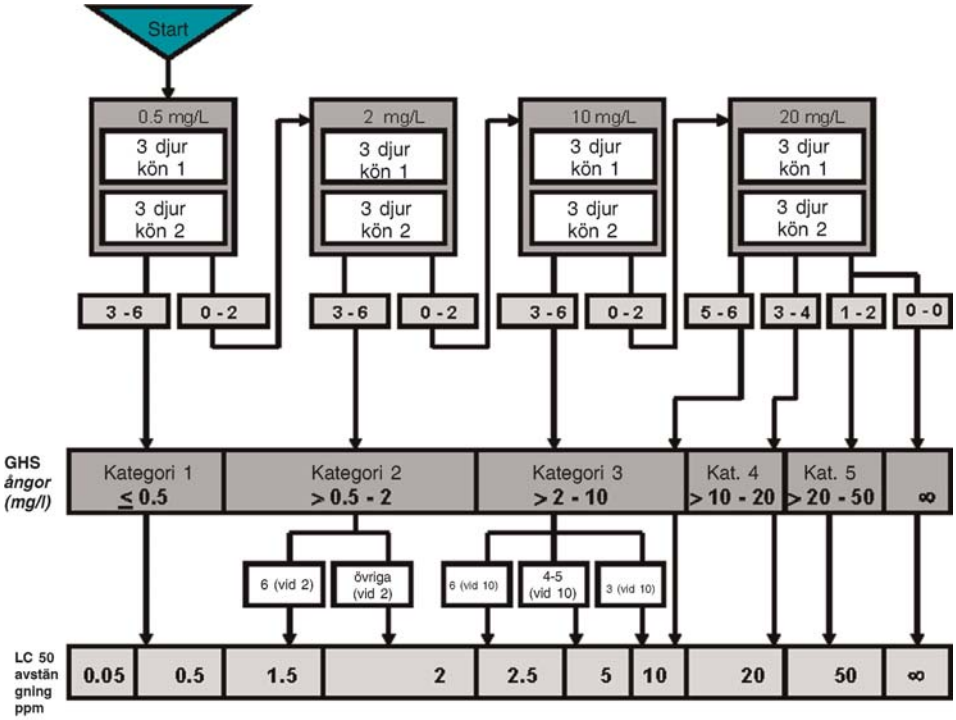
([1]) I följande tabeller refereras till GHS (Globally Harmonised System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). EU-motsvarigheten är förordning (EG) nr 1272/2008. När det gäller akut inhalationstoxicitet, tillämpar inte förordning (EG) nr 1272/2008 (9) kategori 5.

▼M4

Tillägg 3a

Akut inhalationstoxicitet:

Testförfarande med en startkoncentration av 0,5 mg/L/4 h för ångor



— 3 ♂ + 3 ♀, eller 6 djur av det mer mottagliga könet används per steg

— 0-6: antal döende eller döda djur/testad koncentration

— GHS: Globally Harmonized Classification System

— ∞: oklassifierad

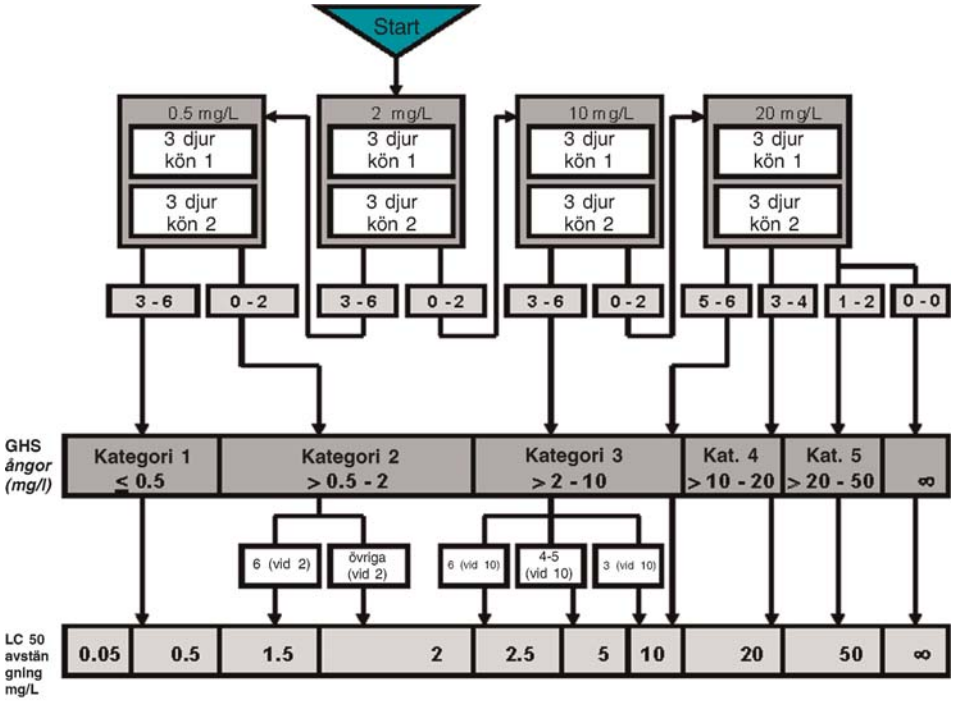
— Testning vid 50 mg/L/4h: se vägledningsdokument 39 (8)

▼M4

Tillägg 3b

Akut Inhalationstoxicitet:

Testförfarande med en startkoncentration av 2 mg/L/4 h för ångor



— 3 ♂ + 3 ♀, eller 6 djur av det mer mottagliga könet används per steg

— 0–6: antal döende eller döda djur/testad koncentration

— GHS: Globally Harmonized Classification System

— ∞: oklassifierad

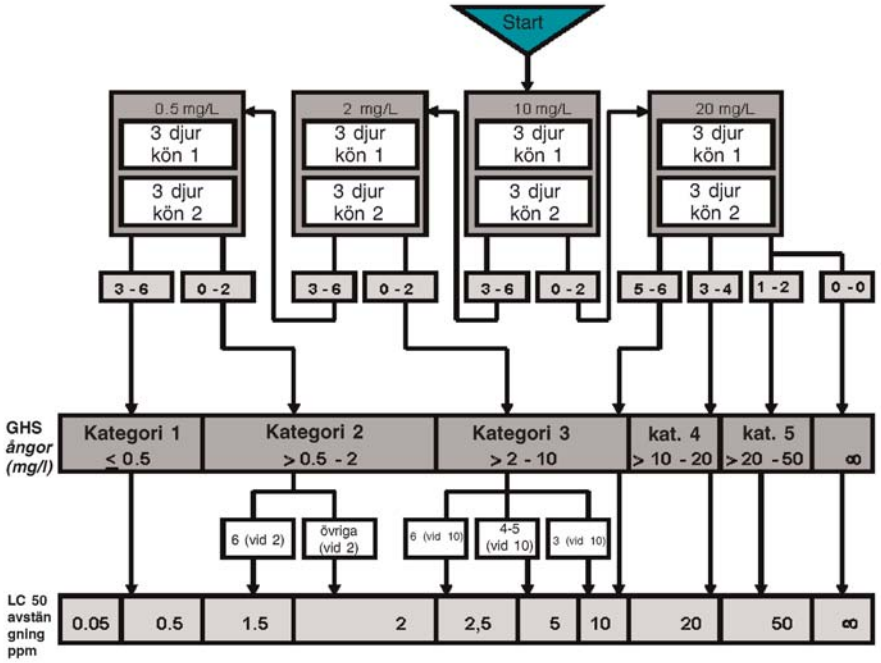
— Testning vid 50 mg/L/4h: se vägledningsdokument 39 (8)

▼M4

Tillägg 3c

Akut Inhalationstoxicitet:

Testförfarande med en startkoncentration av 10 mg/L/4 h för ångor



— 3 ♂ + 3 ♀, eller 6 djur av det mer mottagliga könet används per steg

— 0–6: antal döende eller döda djur/testad koncentration

— GHS: Globally Harmonized Classification System

— ∞: oklassifierad

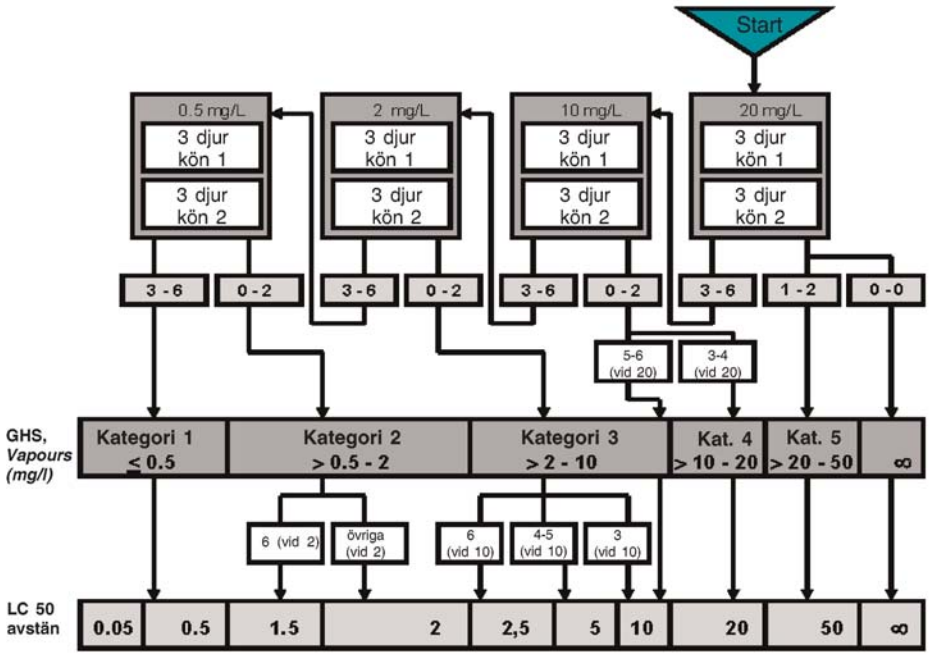
— Testning vid 50 mg/L/4h: se vägledningsdokument 39 (8)

▼M4

Tillägg 3d

Akut Inhalationstoxicitet:

Testförfarande med en startkoncentration av 20 mg/L/4 h för ångor



— 3 ♂ + 3 ♀, eller 6 djur av det mer mottagliga könet används per steg

— 0-6: Antal döende eller döda djur/testad koncentration

— GHS: Globally Harmonized Classification System

— ∞: oklassifierad

— Testning vid 50 mg/L/4h: se vägledningsdokument 39 (8)

▼M4

Tillägg 4

Förfarande för varje startkoncentration för aerosoler (mg/l/4 h)

Allmänna anmärkningar ([1])

För varje startkoncentration ska förfarandet som är beskrivet i detta tillägg följas för respektive testprogram.

Tillägg 4 a: Startkoncentration är 0,05 mg/l

Tillägg 4 b: Startkoncentration är 0,5 mg/l

Tillägg 4 c: Startkoncentration är 1 mg/l

Tillägg 4 d: Startkoncentration är 5 mg/l

Beroende på antalet humant avlivade eller döda djur ska testproceduren följa de angivna pilarna.

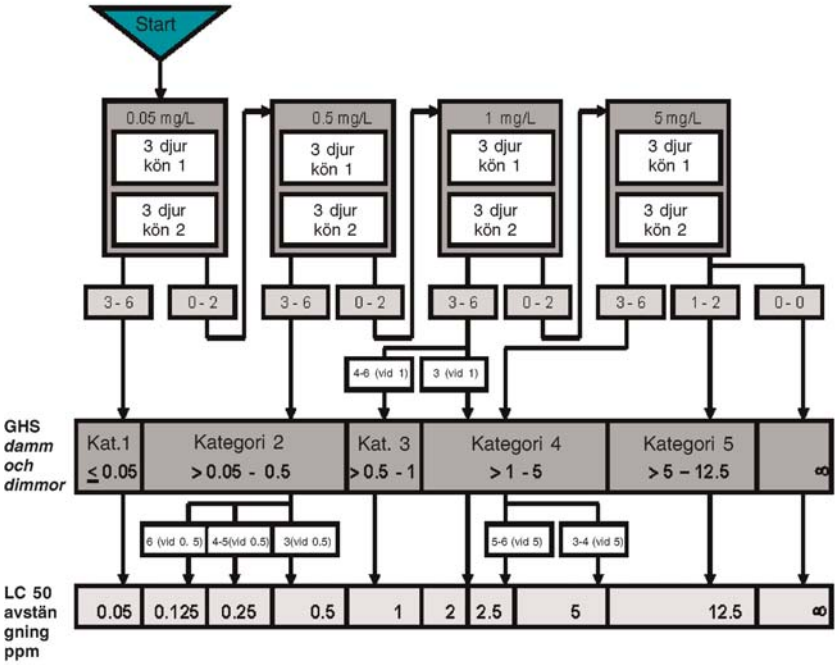
([1]) I följande tabeller refereras till GHS (Globally Harmonised System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). EU-motsvarigheten är förordning (EG) nr 1272/2008. När det gäller akut inhalationstoxicitet, tillämpar inte förordning (EG) nr 1272/2008 (9) kategori 5.

▼M4

Tillägg 4a

Akut Inhalationstoxicitet:

Testförfarande med en startkoncentration av 0,05 mg/L/4h för ångor



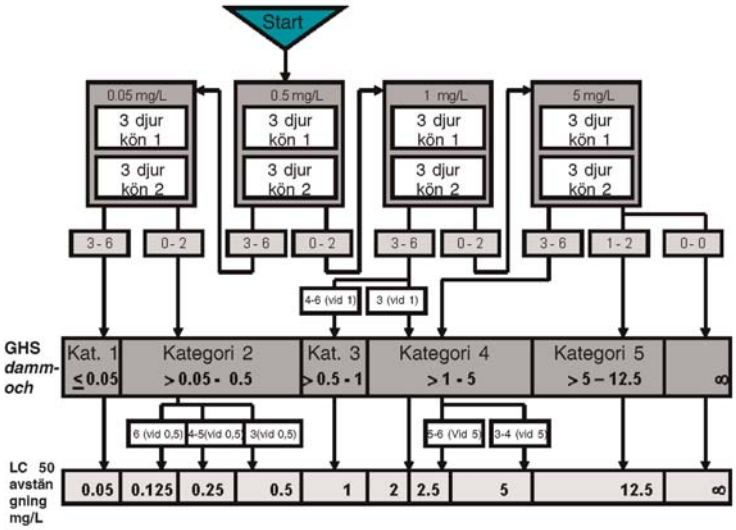
— 3 ♂ + 3 ♀, eller 6 djur av det mer mottagliga könet används per steg
— 0-6: Antal döende eller döda djur/testad koncentration
— GHS: Globally Harmonized Classification System
— ∞: oklassifierad
— Testning vid 12,5 ng/L/4h: se vägledningsdokument 39 (8)

▼M4

Tillägg 4b

Akut inhalationstoxicitet:

Testförfarande med en startkoncentration av 0,5 mg/L/4h för aerosoler



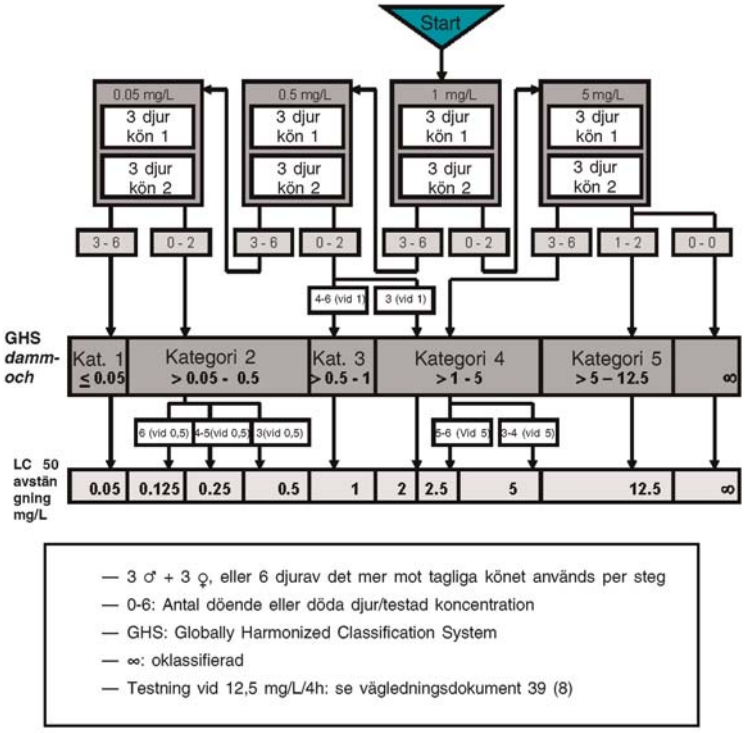
— 3 ♂ + 3 ♀, eller 6 djurav det mer mot tagliga könet används per steg
— 0-6: Antal döende eller döda djur/testad koncentration
— GHS: Globally Harmonized Classification System
— ∞: oklassifierad
— Testning vid 12,5 mg/L/4h: se vägledningsdokument 39 (8)

▼M4

Tillägg 4c

Akut inhalationstoxicitet:

Testförfarande med en startkoncentration av 1 mg/L/4h för aerosoler



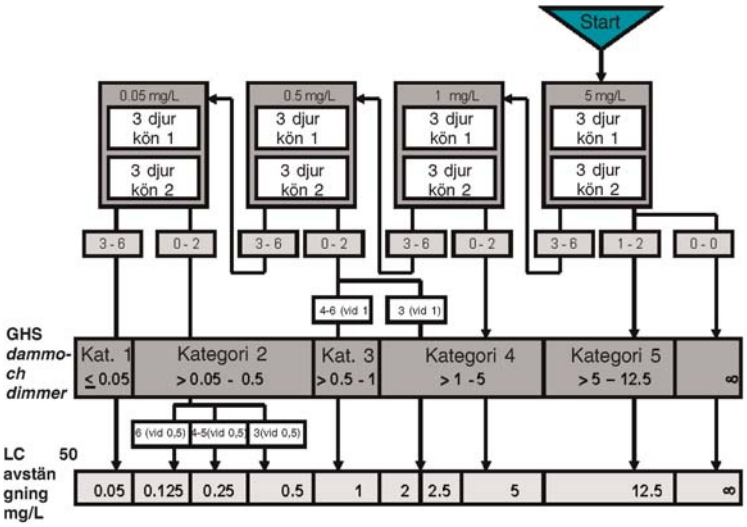
— 3 ♂ + 3 ♀, eller 6 djurav det mer mot tagliga könet används per steg
— 0-6: Antal döende eller döda djur/testad koncentration
— GHS: Globally Harmonized Classification System
— ∞: oklassifierad
— Testning vid 12,5 mg/L/4h: se vägledningsdokument 39 (8)

▼M4

Tillägg 4d

Akut Inhalationstoxicitet:

Testförfarande med en startkoncentration av 5 mg/L/4h för aerosoler



— 3 ♂ + 3 ♀, eller 6 djurav det mer mot tagliga könet används per steg
— 0-6: Antal döende eller döda djur/testad koncentration
— GHS: Globally Harmonized Classification System
— ∞: oklassifierad
— Testning vid 12,5 mg/L/4h: se vägledningsdokument 39 (8)"

▼M5

B.53 STUDIE AV UTVECKLINGSNEUROTOXICITET

INLEDNING

1. Denna testmetod motsvarar OECD:s testriktlinje (TG) 426 (2007). En OECD-arbetsgrupp för reproduktions- och utvecklingstoxicitet diskuterade i Köpenhamn i juni 1995 behovet av att uppdatera befintliga OECD-testriktlinjer för reproduktions- och utvecklingstoxicitet samt utarbeta nya riktlinjer för endpoints som ännu inte omfattas (se hänvisning 1). Arbetsgruppen rekommenderade att en testriktlinje för utvecklingsneurotoxicitet bör skrivas på grundval av en riktlinje från den amerikanska miljöskyddsmyndigheten, som sedan dess har reviderats (se hänvisning 2). I juni 1996 hölls ett andra samrådsmöte i Köpenhamn för att förse sekretariatet med vägledning om utkast till en ny testriktlinje för utvecklingsneurotoxicitet, inklusive de viktigaste delarna som t.ex. uppgifter om val av djurart, doseringsperiod, testperiod, endpoints som ska bedömas och kriterier för utvärdering av resultaten. En amerikansk riktlinje för riskbedömning av neurotoxicitet publicerades 1998 (se hänvisning 3). Ett OECD-expertmöte och en ILSI Risk Science Institute-workshop hölls direkt efter varandra i oktober 2000 och ett expertmöte hölls i Tokyo 2005. Dessa möten hölls för att diskutera vetenskapliga och tekniska frågor i samband med den aktuella testriktlinjen, och rekommendationerna från mötena (se hänvisning 4, 5, 6, 7) övervägdes vid utarbetandet av denna testmetod. Ytterligare information om genomförandet, tolkningen och terminologin som används för denna testmetod finns i OECD:s vägledning nr 43 om testning och utvärdering av reproduktionstoxicitet (se hänvisning 8) och nr 20 om testning av neurotoxicitet (se hänvisning 9).

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN

2. Ett antal kemikalier är kända för att ge utvecklingsneurotoxiska effekter hos människor och andra arter (se hänvisning 10, 11, 12, 13). Bestämning av risken för utvecklingsneurotoxicitet kan behövas för att bedöma och utvärdera de toxiska egenskaperna hos en kemikalie. Utvecklingsneurotoxiska studier är utformade för att tillhandahålla uppgifter, bland annat dos-responskarakterisering av de potentiella funktionella och morfologiska effekterna på utvecklingen av nervsystemet hos avkomman som kan uppstå vid exponering i livmodern och tidigt i livet.

3. En studie om utvecklingsneurotoxicitet kan genomföras som en separat studie som ingår i en studie om reproduktionstoxicitet och/eller vuxenneurotoxicitet (t.ex. testmetoderna B.34 [se hänvisning 14], B.35 [se hänvisning 15], B.43 [se hänvisning 16]), eller läggas till i en studie om prenatal utvecklingstoxicitet (t.ex.testmetod B.31 [se hänvisning 17]). När studien om utvecklingsneurotoxicitet införlivas i, eller ansluts till, en annan studie är det viktigt att bevara integriteten för båda studietyperna. Alla tester ska följa gällande lagstiftning eller statliga och institutionella riktlinjer för användning av försöksdjur inom forskningen (se t.ex.hänvisning 18).

4. Testlaboratoriet bör analysera all tillgänglig information om testkemikalien innan studien genomförs. Sådan information innehåller kemikaliens identitet och struktur, dess fysikalisk-kemiska egenskaper, resultaten från andra *in vitro*- eller *in vivo*-toxicitetsstudier av kemikalien, toxikologiska data om strukturellt närbesläktade kemikalier samt den förväntade användningen av kemikalien. Denna information är nödvändig för att förvissa alla berörda parter om att testet är relevant för skyddet av människors hälsa, och att det är behjälpligt vid valet av en lämplig startdos.

▼M5

PRINCIP FÖR TESTMETODEN

5. Testkemikalien administreras till djuren under dräktighet och laktation. Moderdjur testas för att bedöma effekter hos dräktiga och lakterande honor och kan också ge jämförande information (moderdjur kontra avkomma). Avkomman är slumpmässigt utvald inom kullarna för utvärdering av neurotoxicitet. Utvärderingen består av observationer för att upptäcka grova neurologiska och beteendemässiga avvikelser, inklusive en bedömning av fysisk utveckling, beteendemässig ontogeni, motorik, motoriska och sensoriska funktioner och inlärning och minne, samt utvärderingen av hjärnvikter och neuropatologi under postnatal utveckling och vuxenliv.

6. När testmetoden genomförs som en separat studie kan ytterligare tillgängliga djur i varje grupp användas för specifika neurobeteendemässiga, neuropatologiska, neurokemiska eller elektrofysiologiska förfaranden som kan komplettera uppgifterna från de undersökningar som rekommenderas i denna testmetod (se hänvisning 16, 19, 20, 21). De kompletterande förfarandena kan vara särskilt användbara när empirisk observation, förväntade effekter eller mekanism/tillvägagångssätt indikerar en viss typ av neurotoxicitet. Dessa kompletterande förfaranden kan användas för moderdjuren såväl som för avkomman. Dessutom kan *ex vivo*- eller *in vitro*-förfaranden också användas, förutsatt att dessa förfaranden inte förändrar integriteten för *in vivo*-förfarandena.

FÖRBEREDELSER FÖR TESTET

Val av djurart

7. Rekommenderad testart är råtta. Andra arter kan användas vid behov. Observera dock att dräktighetsdagar (GD) och postnatala dagar (PND) som anges i denna testmetod är specifika för de råttstammar som vanligen används, och jämförbara dagar bör väljas om en annan art eller ovanlig stam används. Användningen av annan art bör motiveras utifrån toxikologiska, farmakokinetiska och/eller andra data. Motiveringen bör omfatta tillgängligheten av artspecifika postnatala neurobeteendemässiga och neuropatologiska bedömningar. Om ett tidigare test föranlett problem, bör arten/stammen som varit problematisk beaktas. På grund av de skilda prestandaattributen hos olika råttstammar, bör det finnas evidens för att den stam som ska användas har adekvat fruktsamhet och mottaglighet. Andra arters tillförlitlighet och känslighet när det gäller att upptäcka utvecklingsneurotoxicitet bör dokumenteras.

Inhysnings- och utfodringsförhållanden

8. Temperaturen i djurutrymmet bör vara 22 ± 3 °C. Den relativa fuktigheten bör vara minst 30 % och helst inte överstiga 70 %, utom när rummet rengörs då målet bör vara 50–60 %. Artificiell belysning bör användas, med en dygnsrytm på 12 timmar ljus och 12 timmar mörker. Det är också möjligt att vända ljuscykeln före parningen och under hela studien, för att utföra bedömningar av funktionella och beteendemässiga endpoints under mörkerperioden (vid rött ljus), dvs. under den tid som djuren normalt är aktiva (se hänvisning 22). Eventuella förändringar i ljus-mörkercykeln bör innefatta tillräcklig acklimatiseringstid för att låta djuren anpassa sig till den nya cykeln. För utfodringen kan konventionellt laboratoriefoder användas med fri tillgång till dricksvatten. Den typ av foder och vatten som används bör redovisas och båda bör analyseras beträffande föroreningar.

▼M5

9. Djuren kan inhysas individuellt eller i burar i små grupper av samma kön. Parningsförfarandena bör utföras i burar som är lämpliga för ändamålet. Efter tecken på parning, eller senast dag 15 av dräktigheten, bör parade djur inhysas separat i förlossnings- eller moderskapsburar. Burarna bör placeras så att eventuell påverkan beroende på deras placering blir så liten som möjligt. Parade honor bör förses med lämpliga och definierade material i redet när nedkomsten är nära. Det är allmänt känt att olämplig hantering eller stress under dräktigheten kan leda till motsatt resultat, inberäknat prenatal förlust samt förändrad fosterutveckling och postnatal utveckling. Som skydd mot förlust av foster genom faktorer som inte är behandlingsrelaterade, bör djuren hanteras varsamt under dräktigheten och stress från yttre faktorer såsom högt buller bör undvikas.

Förberedelse av djuren

10. Friska djur ska användas vilka har acklimatiserats till laboratoriemiljön och inte använts i tidigare försöksförfaranden, såvida inte studien ingår i en annan studie (se punkt 3). Försöksdjuren bör karakteriseras efter art, stam, ursprung, kön, vikt och ålder. Varje djur tilldelas och märks med ett unikt identifieringsnummer. Djuren i alla testgrupper bör, så vitt det är praktiskt möjligt, ha enhetlig vikt och ålder och ligga inom det normala intervallet för den art och stam som studeras. Unga vuxna honor utan avkomma bör användas vid varje dosnivå. Syskon ska inte paras och försiktighet bör iakttas för att säkerställa detta. Dräktighetsdagen (GD) 0 är den dag då en vaginalplugg och/eller sperma observeras. Adekvat acklimatiseringstid (t.ex.2–3 dagar) bör tillåtas vid köp av tidsdräktiga djur från en leverantör. Parade honor bör anvisas på ett opartiskt sätt till kontroll- och behandlingsgrupperna och så vitt det är möjligt bör de fördelas jämnt mellan grupperna (t.ex.ett stratifierat slumpmässigt förfarande rekommenderas för att ge en jämn fördelning i alla grupper, exempelvis baserat på kroppsvikt). Honor som har befruktats av samma hane bör fördelas jämnt i grupperna.

FÖRFARANDE

Djurens antal och kön

11. Varje test- och kontrollgrupp bör innehålla ett tillräckligt antal dräktiga honor som ska exponeras för testkemikalien, för att säkerställa att ett tillräckligt antal avkommor produceras för utvärderingen av neurotoxicitet. Sammanlagt 20 kullar rekommenderas vid varje dosnivå. Doseringsutformningar med replikat och förskjutna grupper är tillåtna om det totala antalet kullar per grupp uppnås och om lämpliga statistiska modeller används för att redovisa replikat.

12. Senast postnatal dag (PND) 4 (nedkomstdag är PND 0), bör storleken på varje kull justeras genom att extra ungar utesluts genom ett slumpmässigt urval för att ge en enhetlig kullstorlek för alla kullar (se hänvisning 23). Kullens storlek ska inte överstiga den genomsnittliga kullstorleken för den stam av gnagare som används (8–12). Kullen bör i möjligaste mån ha lika många han- och honungar. Selektiv uteslutning av ungar,t.ex.baserat på kroppsvikt, är inte lämpligt. Efter standardisering av kullarna (gallring) och före vidare testning av funktionella endpoints, bör enskilda ungar som är schemalagda för testning före eller efter avvänjningen identifieras unikt med hjälp av en lämplig human metod för identifiering (se t.ex. hänvisning24).

▼M5

Anvisning av djur till funktions- och beteendetester, hjärnvikter och neuropatologiska utvärderingar

13. Testmetoden medger olika tillvägagångssätt när det gäller anvisning av djur som exponerats *in utero* och genom laktation till funktions- och beteendetester, könsmognad, fastställande av hjärnvikt och neuropatologisk utvärdering (se hänvisning 25). Andra tester av kognitiva funktioner (t.ex. socialt beteende), neurokemi eller neuropatologi kan läggas till i en bedömning från fall till fall, så länge integriteten hos de ursprungliga nödvändiga testerna inte äventyras.

14. Ungar väljs ut från varje dosgrupp och anvisas till endpointbedömning på PND 4 eller senare. Urvalet av ungar bör utföras så att, i möjligaste mån, båda könen från varje kull i varje dosgrupp är lika representerade i alla test. För testning av motorisk aktivitet bör samma par av han- och honungar testas vid alla åldrar före avvänjningen (se punkt 35). För alla andra tester kan samma eller separata par av han- och hondjur anvisas till olika beteendetester. Olika ungar kan behöva anvisas till tester av kognitiv funktion för avvanda djur kontra vuxna för att undvika störning av effekter från ålder och tidigare träning på dessa mätningar (se hänvisning 26, 27). Vid avvänjning (PND 21) kan ungar som inte valts ut för testning avlivas på ett humant sätt. Eventuella förändringar i anvisning av ungar ska redovisas. Den statistiska enheten bör vara kullen (eller moderdjuret), och inte ungen.

15. Det finns olika sätt att anvisa avkommor till undersökningar före och efter avvänjning, kognitiva tester, patologiska undersökningar etc., (se figur 1 för allmän utformning, och tillägg 1 för exempel på anvisning). Rekommenderat minsta antal djur i varje dosgrupp för undersökningar före och efter avvänjning är följande:

Kliniska observationer och kroppsvikt	Alla djur
Detaljerade kliniska observationer	20/kön (1/kön/kull)
Hjärnvikt (efter fixering) PND 11–22	10/kön (1/kull)
Hjärnvikt (ej fixerad) ~ PND 70	10/kön (1/kull)
Neuropatologi (immersions- eller perfusionsfixering) PND 11–22	10/kön (1/kull)
Neuropatologi (perfusionsfixering) PND ~ 70	10/kön (1/kull)
Könsmognad	20/kön (1/kön/kull)
Andra utvecklingsmarkörer (valfria)	Alla djur
Beteendeontogeni	20/kön (1/kön/kull)
Motorisk aktivitet	20/kön (1/kön/kull)
Motoriska och sensoriska funktioner	20/kön (1/kön/kull)
Inlärning och minne	10/kön ([a]) (1/kull)

([a]) Beroende på hur känsliga de kognitiva funktionstesterna är, bör en undersökning med ett större antal djur övervägas, t.ex. upp till 1 hane och 1 hona per kull (för djurtilldelning, se tillägg 1) (ytterligare vägledning om urvalsstorlek finns i OECD:s vägledning 43 [se hänvisning 8]).

▼M5

Dosering

16. Minst tre dosnivåer och en jämsides behandlad kontroll ska användas. Dosnivåerna bör spridas ut för att ge en gradering av de toxiska effekterna. Den högsta dosnivån ska väljas, om kemikalien inte har några begränsningar på grund av sina fysikalisk-kemiska eller biologiska egenskaper, i syfte att framkalla en viss maternell toxicitet (t.ex. kliniska tecken, minskad viktuppgång (högst 10 %) och/eller tecken på dosbegränsande toxicitet i ett målorgan). Den höga dosen kan begränsas till 1 000 mg/kg/dag kroppsvikt, med några undantag. Exempelvis kan förväntad exponering av människor indikera ett behov av att använda en högre dosnivå. Alternativt bör pilotstudier eller preliminära dosfinnande studier utföras för att fastställa den högsta dos som ska användas för att producera en minimal grad av maternell toxicitet. Om testkemikalien har visat sig vara utvecklingsmässigt toxisk, antingen i en vanlig undersökning av fosterskadande effekter eller i en pilotstudie, bör den högsta dosnivån vara den högsta dos som inte framkallar alltför stor toxicitet i avkomman, eller *in utero* eller neonatal död eller missbildning, tillräckligt för att utesluta en meningsfull utvärdering av neurotoxicitet. Den lägsta dosen bör syfta till att inte ge några tecken på vare sig maternell eller utvecklingsmässig toxicitet, inklusive neurotoxicitet. En fallande dosnivå bör väljas i syfte att påvisa en eventuell dosrelaterad respons och en nivå där ingen skadlig effekt observeras (Noael) eller doser nära detektionsgränsen vilka gör det möjligt att fastställa en referensdos. Två- till fyrfaldiga dosintervall är ofta optimala för de fallande dosnivåerna, och att lägga till en fjärde dosgrupp är att föredra framför att använda mycket stora intervall (t.ex. mer än en faktor på 10) mellan doseringarna.

17. Dosnivåerna bör väljas med hänsyn till alla befintliga toxicitetsdata samt ytterligare information om metabolism och toxikokinetik hos testkemikalien eller närbesläktade ämnen. Denna information kan också hjälpa till att visa doseringsschemats lämplighet. Direktdosering av ungar bör övervägas baserat på exponeringsinformation och farmakokinetisk information (se hänvisning 28, 29). Fördelar och nackdelar bör övervägas noga innan direktdoseringsstudier utförs (se hänvisning 30).

18. Den jämsides behandlade kontrollgruppen bör vara en kontrollgrupp som får en overksam behandling (placebo) eller en vehikelkontrollgrupp om en vehikel används för tillförsel av testkemikalien. Samtliga djur bör normalt ges samma volym av antingen testkemikalien eller vehikeln baserat på kroppsvikten. Om en vehikel eller annan tillsats används för att underlätta doseringen ska hänsyn tas till följande egenskaper: påverkan på absorption, distribution, metabolism eller lagring av testkemikalien; effekter på testkemikaliens kemiska egenskaper som kan ändra dess toxiska egenskaper, samt påverkan på foder- eller vattenkonsumtionen eller djurens näringsstatus. Vehikeln ska inte leda till effekter som kan störa tolkningen av studien, inte heller ska den vara neurobeteendetoxisk eller ha effekter på fortplantning eller utveckling. När det gäller nya vehiklar bör en placebobehandlad kontrollgrupp ingå förutom en vehikelkontrollgrupp. Djur i kontrollgrupper ska hanteras på samma sätt som djur i testgrupper.

▼M5

Administration av doser

19. Testkemikalien eller vehikeln bör ges på det sätt som är mest relevant för potentiell exponering av människor och baserat på tillgänglig information om metabolism och spridning i försöksdjuren. Administrationsvägen är i allmänhet oral (t.ex.sondmatning, via föda, via dricksvatten) men andra vägar (t.ex.hud eller inandning) kan användas beroende på egenskaper och förväntade eller kända vägar för mänsklig exponering (ytterligare vägledning finns i vägledningsdokument 43 [se hänvisning 8]). Motivering bör ges för valet av administrationsväg. Testkemikalien bör ges vid ungefär samma tid varje dag.

20. Den dos som ges till varje djur ska normalt baseras på den senaste bestämningen av individuell kroppsvikt. Dock bör försiktighet iakttas vid justering av doser under sista tredjedelen av dräktigheten. Om överskottstoxicitet noteras i de behandlade moderdjuren bör dessa avlivas på ett humant sätt.

21. Testkemikalien eller vehikeln bör, som ett minimum, administreras dagligen till parade honor från tiden för implanteringen (GD 6) och under laktationen (PND 21), så att avkomman är exponerad för testkemikalien under den pre- och postnatala neurologiska utvecklingen. Den ålder då doseringen startar, och doseringens varaktighet och frekvens, kan justeras om evidens stöder en experimentell utformning som är mer relevant för mänsklig exponering. Doseringsvaraktigheter bör justeras för andra arter för att säkerställa exponering under alla tidiga perioder av hjärnans utveckling (dvs., motsvarande prenatal och tidig postnatal tillväxt av den mänskliga hjärnan). Doseringen kan börja när dräktigheten inleds (GD 0), även om man bör överväga risken för att testkemikalien kan orsaka preimplantatorisk förlust. Administration som börjar på GD 6 skulle kunna undvika denna risk, men utvecklingsstadierna mellan GD 0 och GD 6 skulle då inte behandlas. När ett laboratorium köper tidsparade djur är det opraktiskt att börja dosera på GD 0, och därmed vore GD 6 en bra startdag. Testlaboratoriet bör ställa in doseringsschemat i enlighet med relevant information om testkemikaliens effekter, tidigare erfarenhet och logistiska faktorer; detta kan omfatta en förlängning av doseringen förbi avvänjningen. Doseringen bör inte ske på nedkomstdagen hos de djur som inte har fött fram hela sin avkomma. I allmänhet antas det att exponering av ungarna sker via modersmjölken, dock ska direktdosering av ungar övervägas i de fall då det saknas evidens på fortsatt exponering av avkomman. Belägg för kontinuerlig exponering kan t.ex.hämtas från farmakokinetisk information, toxicitet hos avkomma eller förändringar av biologiska markörer (se hänvisning 28).

OBSERVATIONER

Observation av moderdjur

22. Alla moderdjur bör observeras noga minst en gång dagligen avseende deras hälsotillstånd, inbegripet sjuklighet och dödlighet.

23. Under behandlings- och observationsperioderna bör mer detaljerade kliniska observationer utföras regelbundet (minst två gånger under dräktighetsdoseringsperioden och två gånger under laktationsdoseringsperioden) med minst tio moderdjur per dosnivå. Djuren ska observeras utanför buren av utbildade tekniker som är omedvetna om djurens behandling, med hjälp av standardiserade procedurer som minimerar djurens stress och observatörernas partiskhet och maximerar tillförlitligheten mellan observatörer. Om det är möjligt bör observationerna i en given studie göras av samma tekniker.

▼M5

24. Förekomst av observerade tecken ska registreras. När det är möjligt bör också de observerade tecknens omfattning registreras. Kliniska observationer bör omfatta, men inte begränsas till, förändringar av hud, päls, ögon och slemhinnor, förekomst av sekret och autonom aktivitet (t.ex.tårflöde, piloerektion, pupillstorlek, ovanligt andningsmönster och/eller munandning, och eventuella ovanliga tecken på urinering eller avföring).

25. Eventuella ovanliga reaktioner med avseende på kroppsställning, aktivitetsnivå (t.ex.minskad eller ökad utforskning av standardområdet) och samordning av rörelser bör också noteras. Förändringar i gång, (t.ex.vaggande, ataxi), kroppsställning (t.ex.krökt rygg) och reaktivitet mot hantering, placering eller andra miljömässiga stimuli, liksom förekomst av kloniska eller toniska rörelser, konvulsioner, darrningar, stereotypier (t.ex.överdrivet putsande, ovanliga huvudrörelser, repetitivt cirklande), bisarrt beteende (t.ex.bitande eller överdrivet slickande, självstympning, baklängesgång, vokalisering) eller aggressioner bör registreras.

26. Tecken på toxicitet bör registreras, inklusive dag för första tecken, tid på dygnet, grad och varaktighet.

27. Djuren bör vägas vid doseringstidpunkten minst en gång i veckan under hela studien, på eller nära nedkomstdagen, och på PND 21 (avvänjning). Vid sondmatningsstudier bör moderdjuren vägas minst två gånger per vecka. Doserna ska vid behov justeras i samband med varje bestämning av kroppsvikt. Foderkonsumtionen bör mätas minst en gång i veckan under dräktighet och laktation. Vattenförbrukningen bör mätas minst en gång i veckan om exponeringen sker via vattenförsörjningen.

Observationer av avkomma

28. All avkomma bör observeras noggrant minst en gång per dag för att upptäcka eventuella tecken på toxicitet, sjuklighet och dödlighet.

29. Under behandlings- och observationsperioderna bör mer detaljerade kliniska observationer av avkomman genomföras. Avkomman (minst en unge per kön/kull) bör observeras av utbildade tekniker som är omedvetna om djurens behandling, med hjälp av standardiserade procedurer som minimerar partiskheten och maximerar tillförlitligheten mellan observatörer. Om möjligt bör observationerna göras av samma tekniker. Som ett minimum, bör de endpoints som beskrivs i punkterna 24 och 25 övervakas på lämpligt sätt för det utvecklingsstadium som observeras.

30. Alla tecken på toxicitet hos avkomman bör registreras, inklusive dag för första tecken, tid på dygnet, grad och varaktighet.

Fysiska och utvecklingsmässiga markörer

31. Förändringar i utvecklingsmarkörer före avvänjningen (t.ex.ytterörats utvikning, ögonöppning, tandsprickning) är starkt korrelerade med kroppsvikten (se hänvisning 30, 31). Kroppsvikten kan vara den bästa indikatorn på fysisk utveckling. Mätning av utvecklingsmarkörer rekommenderas därför endast när det finns tidigare belägg på att dessa endpoints kan ge ytterligare information. Tidpunkten för bedömningen av dessa parametrar anges i tabell 1. Beroende på de förväntade effekterna och resultaten av de inledande mätningarna, kan det vara lämpligt att lägga till ytterligare tidpunkter eller att utföra mätningarna under andra utvecklingsstadier.

▼M5

32. Det är lämpligt att använda postkoital ålder i stället för postnatal ålder vid bedömning av fysisk utveckling (se hänvisning 33). Om avkomman testas på dagen för avvänjningen, rekommenderas att detta test genomförs före själva avvänjningen för att undvika feltolkning på grund av stress i samband med avvänjningen. Dessutom bör inte något test av avkomman ske under två dagar efter avvänjningen.

Tabell 1

Tidpunkt för bedömningen av fysiska och utvecklingsmässiga markörer och av funktionella/beteendemässiga endpoints ([a])

Åldersperioder / Endpoints	Före avvänjning ([b])	Ungdjur ([b])	Unga vuxna ([b])
Fysiska och utvecklingsmässiga markörer			
Kroppsvikt samt kliniska observationer	en gång i veckan ([c])	minst varannan vecka	minst varannan vecka
Hjärnvikt	PND 22 ([d])		vid avslutningen
Neuropatologi	PND 22 ([d])		vid avslutningen
Könsmognad	—	i förekommande fall	—
Andra utvecklingsmarkörer ([e])	i förekommande fall	—	—
Funktionella och beteendemässiga endpoints			
Beteendeontogeni	Minst två mätningar		
Motorisk aktivitet (inklusive tillvänjning)	1–3 gånger ([f])	—	en gång
Motoriska och sensoriska funktioner	—	en gång	en gång
Inlärning och minne	—	en gång	en gång

([a]) Denna tabell visar minsta antalet mättillfällen. Beroende på de förväntade effekterna och resultaten av de inledande mätningarna, kan det vara lämpligt att lägga till ytterligare tidpunkter (t.ex. äldre djur) eller utföra mätningarna under andra utvecklingsstadier.

([b]) Det rekommenderas att avkomman inte testas under två dagar efter avvänjningen (se punkt 32). Rekommenderade åldrar för testning av ungdjur är: lärande och minne = PND 25 ± 2, motoriska och sensoriska funktioner = PND 25 ± 2. Rekommenderade åldrar för att testa unga vuxna är PND 60–70.

([c]) Kroppsvikten bör mätas minst två gånger i veckan vid direktdosering av ungarna för att justera doserna under perioder med snabb viktuppgång.

([d]) Hjärnvikter och neuropatologi kan bedömas vid en tidigare tidpunkt (t.ex. PND 11), vid behov (se punkt 39).

([e]) Andra utvecklingsmarkörer utöver kroppsvikten (t.ex. öppna ögon) bör registreras vid behov (se punkt 31).

([f]) Se punkt 35.

33. Levande avkomma ska räknas och könsbestämmas, t.ex.genom visuell inspektion eller mätning av anogenitalt avstånd (se hänvisning 34, 35), och var och en av ungarna i en kull bör vägas individuellt vid födseln eller strax därefter, minst en gång i veckan under diandet, och minst en gång varannan vecka därefter. När könsmognad utvärderas bör djurets ålder och kroppsvikt bestämmas när vaginal öppning (se hänvisning 36) eller preputial separation (se hänvisning 37) förekommer, hos minst en hane och en hona per kull.

▼M5

Beteendeontogeni

34. Ontogeni för utvalda beteenden bör mätas på minst en unge/kön/kull under lämplig åldersperiod med samma ungar som ska användas på alla testdagar för de beteenden som ska bedömas. Mätningsdagarna ska fördelas jämnt över denna period för att definiera antingen normal eller behandlingsrelaterad förändring i ontogenesen för detta beteende (se hänvisning 38). Följande är några exempel på beteenden för vilka ontogenesen kunde bedömas: upprätningsreflex, negativ geotaxis och motorisk aktivitet (se hänvisning 38, 39, 40).

Motorisk aktivitet

35. Motorisk aktivitet bör övervakas (se hänvisning 41, 42, 43, 44, 45) under perioden före avvänjningen och i vuxen ålder. För testning vid tidpunkten för avvänjningen, se punkt 32. Testperioden bör vara tillräckligt lång för att visa tillvänjning inom perioden för icke-behandlade kontroller. Att använda motorisk aktivitet för att bedöma beteendeontogeni rekommenderas bestämt. Om detta används som ett beteendeontogenitest, bör testningen nyttja samma djur för alla testsessioner före avvänjningen. Testning bör ske tillräckligt ofta för att man ska kunna bedöma ontogenin för tillvänjning inom sessionen (se hänvisning 44). Detta kan kräva tre eller flera tidsperioder före, och inklusive, dagen för avvänjningen (t.ex.PND 13, 17, 21). Test av samma djur eller kullsyskon bör även bör ske i vuxen ålder nära studiens avslutning (t.ex.PND 60–70). Tester på ytterligare dagar kan utföras vid behov. Motorisk aktivitet bör övervakas av en automatisk apparat för aktivitetsregistrering som bör kunna upptäcka både ökad och minskad aktivitet, (dvs. aktivitetsgrundvärdet som mäts av apparaten bör inte vara så låg att upptäckten av minskningar hindras och inte heller så hög att upptäckten av aktivitetsökningar hindras). Varje enhet bör testas genom standardförfaranden, för att så långt som möjligt säkerställa tillförlitlighet i driften mellan olika apparater och mellan olika dagar. I den mån det är möjligt, bör behandlingsgrupperna balanseras mellan enheterna. Varje djur bör testas individuellt. Behandlingsgrupperna bör fördelas jämnt över testtiderna för att undvika aktivitetsmönster kopplade till dygnsrytm stör resultaten. Ansträngningar bör göras för att säkerställa att variationerna i testbetingelserna är minimala och inte systematiskt relaterade till behandlingen. Bland de variabler som kan påverka många beteendemätningar inklusive motorisk aktivitet, är ljudnivån, storlek och form på testburen, temperatur, relativ luftfuktighet, ljusförhållanden, lukter, användning av buren eller en ny provbur, samt miljömässiga störningar.

Motoriska och sensoriska funktioner

36. Motoriska och sensoriska funktioner bör undersökas i detalj minst en gång under adolescensen och en gång under den tidiga vuxenperioden (t.ex.PND 60–70). För testning vid tidpunkten för avvänjningen, se punkt 32. Tillräcklig testning bör utföras för att säkerställa en lämplig kvantitativ provtagning av sensoriska modaliteter (t.ex. somato-sensoriska, vestibulära) och motoriska funktioner (t.ex. styrka, koordination). Några exempel på tester avseende motorisk och sensorisk funktion är extensorreflex (se hänvisning 46), upprätningsreflex (se hänvisning 47, 48), tillvänjning till plötsliga ljud (se hänvisning 40, 49, 50, 51, 52, 53, 54) och framkallade potentialer (se hänvisning 55).

▼M5

Tester av inlärning och minne

37. Ett test av associativ inlärning och minne bör utföras efter avvänjningen (t.ex. 25 ± 2 dagar) och för unga vuxna (PND 60 och äldre). För testning vid tidpunkten för avvänjningen, se punkt 32. Samma eller separata tester kan användas för dessa två utvecklingsstadier. En viss flexibilitet är tillåten vid val av tester för inlärning och minne hos avvanda och vuxna råttor. Emellertid bör testerna vara utformade så att de uppfyller två kriterier. För det första bör inlärningen antingen bedömas som en förändring över flera upprepade inlärningsförsök eller sessioner, eller, i tester som involverar ett enda försök, med hänvisning till ett villkor som kontrollerar icke-associativa effekter av utbildningserfarenheten. För det andra bör testerna omfatta någon mätning av minnet (korttids- eller långtidsminne), utöver den ursprungliga inlärningen (tillägnandet), dock kan denna mätning av minnet inte rapporteras i avsaknad av måttet på tillägnande som erhållits från samma test. Om tester av inlärning och minne avslöjar en påverkan av testkemikalien, kan att ytterligare tester övervägas för att utesluta alternativa tolkningar som baseras på förändringar i sensorisk, motiverande och/eller motorisk kapacitet. Förutom ovanstående två kriterier rekommenderas det att testet av inlärning och minne väljs utifrån dess visade känslighet för den klass av kemikalier som utreds, om sådan information finns tillgänglig i litteraturen. I avsaknad av sådan information, inkluderar följande exempel tester som kan göras för att uppfylla ovanstående kriterier: passivt undvikande (se hänvisning 43, 56, 57), fördröjd-matchning-till-position för vuxen råtta (se hänvisning 58) och för råttungar (se hänvisning 59), olfaktorisk betingning (se hänvisning 43, 60), Morris vattenlabyrint (se hänvisning 61, 62, 63), Biel- eller Cincinnati-labyrint (se hänvisning 64, 65), ”radial arm maze” (se hänvisning 66), T-labyrint (se hänvisning 43), samt förvärv och upprätthållande av schemastyrt beteende (se hänvisning 26, 67, 68). Ytterligare tester beskrivs i litteraturen för avvanda (se hänvisning 26, 27) och för vuxna råttor (se hänvisning 19, 20).

Obduktion

38. Honor kan avlivas efter avvänjning av avkomman.

39. Neuropatologisk utvärdering av avkomman kan genomföras med hjälp av vävnad från djur som avlivats humant på PND 22 eller vid en tidigare tidpunkt mellan PND 11 och PND 22, samt vid studiens avslutning. För avkomma som avlivats från PND 22 bör hjärnvävnaden utvärderas, för djur som avlivats vid avslutningen, bör både centrala nervsystemets (CNS) och perifera nervsystemets (PNS) vävnader utvärderas. Djur som avlivas på PND 22 eller tidigare kan antingen fixeras genom immersion eller perfusion. Djur som avlivas vid studiens avslutning bör fixeras genom perfusion. Under alla moment i prepareringen av vävnadsprover, från perfusion av djuren till dissektion av vävnadsprover, vävnadsbehandling och färgning av utstryksglas bör man använda sig av en balanserad utformning, så att varje sats innehåller representativa prover från varje dosgrupp. Ytterligare vägledning om neuropatologi finns i OECD:s vägledning nr 20 (se hänvisning 9), se även (se hänvisning 103).

Beredning av vävnadsprover

40. Alla större avvikelser som är uppenbara vid obduktionstidpunkten bör noteras. De vävnadsprover som tas bör representera alla stora regioner i nervsystemet. Vävnadsproverna bör bevaras i ett lämpligt fixativ och beredas enligt publicerade histologiska standardprotokoll (se hänvisning 69, 70, 71, 103). Paraffininingjutning är acceptabelt för vävnader från CNS och PNS

▼M5

men användning av osmium i efterfixeringen tillsammans med epoxiinbäddning kan vara lämplig när högre upplösning krävs (t.ex.för perifera nerver, när en perifer neuropati misstänks och/eller för morfometrisk analys av perifera nerver). Hjärnvävnad som samlas in för morfometrisk analys bör ingjutas i lämpligt medium för alla dosnivåer vid samma tidpunkt för att undvika krympning av artefakter, vilket kan förknippas med långvarig lagring i fixativ (se hänvisning 6).

Neuropatologiska undersökningar

41. Syftet med den kvalitativa undersökningen är

i) att identifiera regioner inom nervsystemet som uppvisar tecken på neuropatologiska förändringar,

ii) identifiera olika typer av neuropatologiska förändringar till följd av exponering för testkemikalien och

iii) fastställa allvarlighetsgraden för de neuropatologiska förändringarna.

Representativa histologiska snitt från vävnadsproverna bör undersökas mikroskopiskt av en lämpligt utbildad patolog avseende belägg på neuropatologiska förändringar. Alla neuropatologiska förändringar bör tilldelas en subjektiv klass som anger allvarlighetsgraden. Ett hematoxylin- och eosinfärgämne kan vara tillräckligt för att utvärdera hjärnsnitt från djur som avlivats humant på PND 22, eller tidigare. Emellertid kan ett myelinfärgämne (t.ex.Luxol snabb blå/kresylviolett) och en silverfärg (t.ex.Bielschowskys eller Bodians färgämnen) rekommenderas för snitt av CNS- och PNS-vävnader från djur som avlivas vid studiens avslutning. Med förbehåll för patologens yrkesmässiga bedömning och typen av förändringar som har observerats, kan andra färgämnen anses lämpliga för att identifiera och karakterisera vissa typer av förändringar (t.ex.surt gliafibrillärt protein [GFAP], eller lektin histokemi för att bedöma glia- och mikrogliaförändringar [se hänvisning 72], fluoro-jade för att detektera nekros [se hänvisning 73, 74], eller silverfärgämnen specifika för neural degenerering [se hänvisning 75]).

42. Morfometrisk (kvantitativ) utvärdering bör utföras eftersom dessa uppgifter kan bidra till att upptäcka en behandlingsrelaterad effekt och är värdefulla vid tolkningen av behandlingsrelaterade skillnader i hjärnans vikt eller morfologi (se hänvisning 76, 77). Nervvävnad bör provtas och prepareras för en morfometrisk utvärdering. Morfometriska utvärderingar kan t.ex. omfatta linjära mätningar eller arealmätningar av specifika delar av hjärnan (se hänvisning 78). Linjära mätningar eller arealmätningar kräver att man använder noggrant utvalda homologa snitt baserat på tillförlitliga mikroskopiska markörer (se hänvisning 6). Stereologi kan användas för att identifiera behandlingsrelaterade verkningar på parametrar såsom volym eller cellantal för specifika neuroanatomiska områden (se hänvisning 79, 80, 81, 82, 83, 84).

43. Hjärnan bör undersökas avseende belägg på behandlingsrelaterade neuropatologiska förändringar och lämpliga prover bör tas från alla stora regioner av hjärnan (t.ex. luktbulben, hjärnbarken, hippocampus, basala ganglier, thalamus, hypothalamus, mitthjärnan (tectum, tegmentum och cerebrala pedunklar), pons, medulla oblongata, cerebellum) för att säkerställa en grundlig undersökning. Det är viktigt att snitten tas i samma plan för alla djur. På vuxna djur, som avlivas humant vid studiens avslutning, bör prover tas från representativa delar av ryggmärgen och PNS. De undersökta områdena bör innehålla ögat med synnerv och näthinna, ryggmärgen vid cervikal och lumbal svullnad, dorsala och ventrala rotfibrer, proximala ischiasnerven, proximala tibialnerven (vid knät) och tibialnervens vadmuskelgrenar. Ryggmärgen och perifera nervsnitt bör omfatta diagonala, tvärgående och längsgående snitt.

▼M5

44. Neuropatologiska utvärderingar bör innehålla en undersökning av tecken på utvecklingsskador på nervsystemet (se hänvisning 6, 85, 86, 87, 88, 89) utöver de cellulära förändringarna (t.ex.neuronal vakuolisering, degeneration, nekros), och vävnadsförändringar (t.ex.gliosis, leukocytisk inlagring, cystisk bildning). I detta avseende är det viktigt att behandlingsrelaterade effekter kan särskiljas från normala utvecklingshändelser kända för att inträffa vid ett utvecklingsstadium som motsvarar tidpunkten för avlivningen (se hänvisning 90). Exempel på viktiga förändringar som indikerar utvecklingsmässig skada inkluderar, men är inte begränsad till, följande:

— Förändring av storlek eller form på luktbulberna, storhjärnan eller lillhjärnan.

— Förändringar av relativ storlek på olika hjärnregioner, inklusive minskning eller ökning av storlek på regioner till följd av förlust eller uthållighet hos vanligtvis tillfälliga cellpopulationer eller axonala projektioner (t.ex.externt germinalt lager hos lillhjärnan, hjärnbalken).

— Förändringar i proliferation, migration och differentiering, vilket indikeras av områden med överdriven apoptos eller nekros, grupper eller spridda populationer av ektopiska, desorienterade eller missbildade nervceller, eller förändringar i relativ storlek hos olika lager av kortikala strukturer.

— Förändringar i myelinationsmönster, inklusive en generell minskning av storlek eller förändrad färgning av myeliniserade strukturer.

— Tecken på hydrocefalus, särskilt utvidgning av kamrarna, cerebral akveduktstenos och förtunning av hjärnhalvorna.

Analys av sambandet mellan dos och respons hos neuropatologiska förändringar

45. Följande stegvisa förfarande rekommenderas för de kvalitativa och kvantitativa analyserna av neuropatologi. Först jämförs snitten från högdosgruppen med dem i kontrollgruppen. Om inga tecken på neuropatologiska förändringar påträffas hos djuren i högdosgruppen så krävs inga fler analyser. Om tecken på neuropatologiska förändringar påträffas i högdosgruppen så undersöks djuren i mellan- och lågdosgruppen. Om högdosgruppen faller bort på grund av dödsfall eller annan störande toxicitet, bör hög- och mellandosgruppen analyseras avseende neuropatologiska förändringar. Om det finns eventuella tecken på neurotoxicitet i lägre dosgrupper, bör neuropatologisk analys utföras för dessa grupper. Om eventuella behandlingsrelaterade neuropatologiska förändringar påträffas i den kvalitativa eller kvantitativa undersökningen, bör den dosberoende förekomsten, frekvensen och allvarlighetsgraden av skadorna eller de morfometriska ändringarna fastställas på grundval av en bedömning av samtliga djur i alla dosgrupper. Samtliga regioner i hjärnan som uppvisar tecken på neuropatologiska förändringar bör ingå i denna utvärdering. För varje typ av skada bör de egenskaper som används för att definiera varje allvarlighetsgrad beskrivas och de egenskaper som används för att åtskilja varje klass anges. Frekvensen för varje typ av skada och dess allvarlighetsgrad bör registreras, och en statistisk analys bör utföras för att bedöma hur dos-responssambandet ser ut. Användning av kodade utstryksglas rekommenderas (se hänvisning 91).

DATA OCH RAPPORTERING

Data

46. Data bör rapporteras individuellt och sammanställas i tabellform, och för varje testgrupp visa förändringstyper och antalet moderdjur, avkomma efter kön och kullar för varje typ av förändring. Om direkt postnatal exponering av avkomman har utförts, bör sättet, varaktigheten och exponeringsperioden rapporteras.

▼M5

Utvärdering och tolkning av resultaten

47. En studie av utvecklingsneurotoxicitet ger information om effekterna av upprepad exponering för en kemikalie under *in utero* och tidig postnatal utveckling. Eftersom vikten läggs på endpoints för både allmän toxicitet och utvecklingsneurotoxicitet, kommer resultaten från studien att möjliggöra en åtskillnad mellan neuroutvecklingseffekter som förekommer i frånvaron av allmän maternell toxicitet, och de som bara uttrycks på nivåer som också är giftiga för moderdjuret. På grund av de komplexa sambanden mellan studieutformning, statistisk analys och biologisk signifikans för data, inbegriper en adekvat tolkning av data om utvecklingsneurotoxicitet en expertbedömning (se hänvisning 107, 109). Vid tolkningen av testresultaten bör man använda en metod som bygger på evidensvärde (se hänvisning 20, 92, 93, 94). Mönster av beteendemässiga eller morfologiska fynd bör, om det finns, diskuteras, liksom belägg för dos-respons. Data från alla studier som är relevanta för bedömningen av utvecklingsneurotoxicitet, inklusive mänskliga epidemiologiska studier och fallrapporter, samt experimentella djurstudier (t.ex.toxikokinetiska data, struktur-aktivitetsinformation, data från andra toxicitetsstudier), bör ingå i denna karakterisering. Detta inkluderar relationen mellan doser av testkemikalien och närvaron eller frånvaron, förekomsten och omfattningen av eventuell neurotoxisk effekt för varje kön (se hänvisning 20, 95).

48. Utvärderingen av data bör omfatta en diskussion om både den biologiska och statistiska signifikansen. Statistisk analys bör ses som ett verktyg som vägleder, snarare än bestämmer, tolkningen av data. Avsaknad av statistisk signifikans bör inte vara den enda grunden för att fastslå en avsaknad av behandlingsrelaterad effekt, precis som statistisk signifikans inte bör vara den enda motiveringen för att fastslå en behandlingsrelaterad effekt. För att skydda sig mot eventuella falska negativa fynd och svårigheterna i att ”bevisa ett negativt resultat” bör tillgängliga positiva resultat och historiska kontrolldata diskuteras, särskilt när det saknas behandlingsrelaterade effekter (se hänvisning 102, 106). Sannolikheten för falska positiva resultat bör diskuteras i ljuset av den totala statistiska utvärderingen av data (se hänvisning 96). Utvärderingen bör omfatta det eventuella sambandet mellan observerade neuropatologiska och beteendemässiga förändringar.

49. Samtliga resultat bör analyseras med hjälp av statistiska modeller som är lämpliga för försökets utformning (se hänvisning 108). Valet av en parametrisk eller icke-parametrisk analys bör motiveras med tanke på faktorer såsom typen av data (transformerad eller ej) och fördelning, samt den relativa robustheten i den valda statistiska analysen. Syftet och utformningen av studien bör styra valet av statistiska analyser för att minimera fel av typ I (falskt positiva) och typ II (falskt negativa) (se hänvisning 96, 97, 104, 105). Utvecklingsstudier med hjälp av multipara arter där flera ungar per kull testas, bör inkludera kullen i den statistiska modellen som skydd mot överdrivna felfrekvenser av typ I (se hänvisning 98, 99, 100, 101). Den statistiska enheten bör vara kullen, och inte ungen. Försök bör utformas så att kullsyskon inte behandlas som oberoende observationer. Varje endpoint som mäts upprepade gånger hos samma försöksdjur bör analyseras med hjälp av statistiska modeller som står för icke-oberoendet hos dessa mätningar.

Testrapport

50. Testrapporten ska innehålla följande information:

Testkemikalie:

— Fysikalisk form och, när så är tillämpligt, fysikalisk-kemiska egenskaper.

— Identifieringsdata, inklusive källa.

▼**M5**

— Beredningens renhet, samt kända och/eller förväntade föroreningar.

Vehikel (i förekommande fall):

— Motivering för val av vehikel, om annan än vatten eller fysiologisk koksaltlösning.

Försöksdjur:

— Art och stam som används, samt en motivering om annat än råtta används.

— Leverantör av försöksdjur.

— Djurens antal, ålder vid start och kön.

— Ursprung, inhysning, foder, vatten etc.

— Djurens individuella vikt vid testets början.

Testbetingelser:

— Grund för val av dosnivå.

— Grund för doseringssätt och tidsperiod.

— Specifikation av tillförda doser, inbegripet uppgifter om vehikel, volym och det tillförda ämnets fysikaliska form.

— Uppgifter om testkemikaliens sammansättning/foderberedning, uppnådd koncentration, beredningens stabilitet och homogenitet.

— Metod som används för att unikt identifiera moderdjur och avkomma.

— En detaljerad beskrivning av de statistiska stickprovsmetoder som används för att anvisa moderdjur till behandlingsgrupperna, välja ungar för avlivning, samt anvisa ungar till testgrupper.

— Uppgifter om administreringen av testkemikalien.

— Omräkning av testkemikaliens koncentration (ppm) från foder/dricksvatten eller genom inhalation till faktisk dos (mg/kg kroppsvikt/dag), i förekommande fall.

— Miljöförhållanden.

— Uppgifter om kvalitet på foder och vatten (t.ex.kran, destillerat).

— Datum för studiens start och slut.

Observationer och testförfaranden:

— En detaljerad beskrivning av de förfaranden som används för att standardisera observationer och förfaranden, samt operationella definitioner för att värdera observationer.

— En förteckning över samtliga testförfaranden, samt motivering av deras användning.

— Uppgifter om de beteendemässiga/funktionella, patologiska, neurokemiska eller elektrofysiologiska metoder som används, inklusive information och detaljer om automatiserade enheter.

— Rutiner för kalibrering och säkerställande av likvärdiga enheter, och balansen mellan behandlingsgrupper i testförfaranden.

— En kort motivering som förklarar eventuella beslut som inbegriper en yrkesmässig bedömning.

▼M5

Resultat (enskilda och sammanfattande, inklusive medelvärde och varians i förekommande fall):

— Antalet djur vid studiens början och i slutet av studien.

— Antalet djur och kullar som används för varje testmetod.

— Identifikationsnummer för varje djur och kullen som den kommer från.

— Kullstorlek och medelvikt vid födseln för respektive kön.

— Kroppsvikt och kroppsviktsförändringsdata, inklusive terminal kroppsvikt för moderdjur och avkomma.

— Uppgifter om foderintag, och i tillämpliga fall uppgifter om vattenintag (t.ex.om testkemikalien tillförs via vatten).

— Uppgifter om toxiska reaktioner för respektive kön och dosnivå, inklusive tecken på toxicitet eller dödlighet, inklusive tidpunkt för, och orsak till dödsfall, om detta är tillämpligt.

— Natur, allvarlighetsgrad, varaktighet, dag för första tecken, tid på dygnet, och efterföljande förlopp för de detaljerade kliniska observationerna.

— Värde för varje utvecklingsmarkör (vikt, könsmognad och beteendeontogeni) vid varje observationstidpunkt.

— En detaljerad beskrivning av alla beteendemässiga, funktionella, neuropatologiska, neurokemiska, elektrofysiologiska fynd för respektive kön, som omfattar både ökningar och minskningar från kontroller.

— Obduktionsfynd.

— Hjärnvikter.

— Eventuella diagnoser som härrör från neurologiska symtom och skador, inklusive naturligt förekommande sjukdomar eller tillstånd.

— Bilder på typiska exempel på fynd.

— Lågupplösta bilder för att bedöma homologi i snitt som används för morfometri.

— Absorptions- och metabolismdata, inklusive kompletterande uppgifter från en separat toxikokinetisk studie, om sådan finns.

— Statistisk bearbetning av resultaten, inklusive statistiska modeller som används för att analysera data, och resultaten, oavsett om de var signifikanta eller ej.

— Förteckning över personal som utför studien, inklusive deras yrkesutbildning.

Diskussion av resultaten:

— Dos-respons-information, för respektive kön och grupp.

— Eventuella toxiska effekters samband med en slutsats om testkemikaliens neurotoxiska potential, för respektive kön och grupp.

— Hur påverkas slutsatserna av eventuell toxikokinetisk information.

— Likheter med effekter från alla kända neurotoxiska ämnen.

▼M5

— Data som stöder testmetodens tillförlitlighet och känslighet (dvs. positiva och historiska kontrolldata).

— Eventuella samband mellan neuropatologiska och funktionella effekter.

— Noael- eller referensdos för moderdjur och avkomma, för respektive kön och grupp.

Slutsatser:

— En diskussion om den övergripande tolkningen av data baserad på resultaten, inklusive en slutsats om huruvida testkemikalien orsakat utvecklingsneurotoxicitet och Noael.

HÄNVISNINGAR

1. OECD (1995). Utkast till rapport från OECD:s *ad hoc*-arbetsgrupp för reproduktion och utvecklingstoxicitet. Köpenhamn, 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. Finns 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. Finns 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., US, 23–25 October 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 finns på: http://search.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(2008)16&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. Finns 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*, *1:a utgåvan*, ISBN 0126488606, Academic Press, New York.

14. Kapitel B.34 i denna bilaga, reproduktionstoxicitetstest på en generation.

15. Kapitel B.35 i denna bilaga, test avseende reproduktionstoxicitet på två generationer.

16. Kapitel B.43 i denna bilaga, test avseende neurotoxicitet på gnagare.

17. Kapitel B.31 i denna bilaga, test avseende prenatal utvecklingstoxicitet.

18. Europaparlamentets och rådets direktiv 2010/63/EU av den 22 september 2010 om skydd av djur som används för vetenskapliga ändamål (EUT L 276, 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, Förenta staterna. Finns 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, Geneva. Finns på: http://www.intox.org/databank/documents/supplem/supp/ehc223.htm

21. Chang, L.W., Slikker, W. (1995) *Neurotoxicology: Approaches and Methods*, 1:a utgåvan, 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. I: *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. I: *Neural Mechanisms of Startle Behavior*, Eaton, R.C. (ed), Plenum Press, New York, pp. 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, pp. 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. I: *Target Organ Toxicology Series: Neurotoxicity*, Tilson, H., Mitchell, C., (eds.), Raven Press, New York. pp. 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. och 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., Waalkens-Berendsen, I.D.H., Waanders, 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., Waalkens-Berendsen, 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. I: *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. Danish Environmental Protection Agency (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**

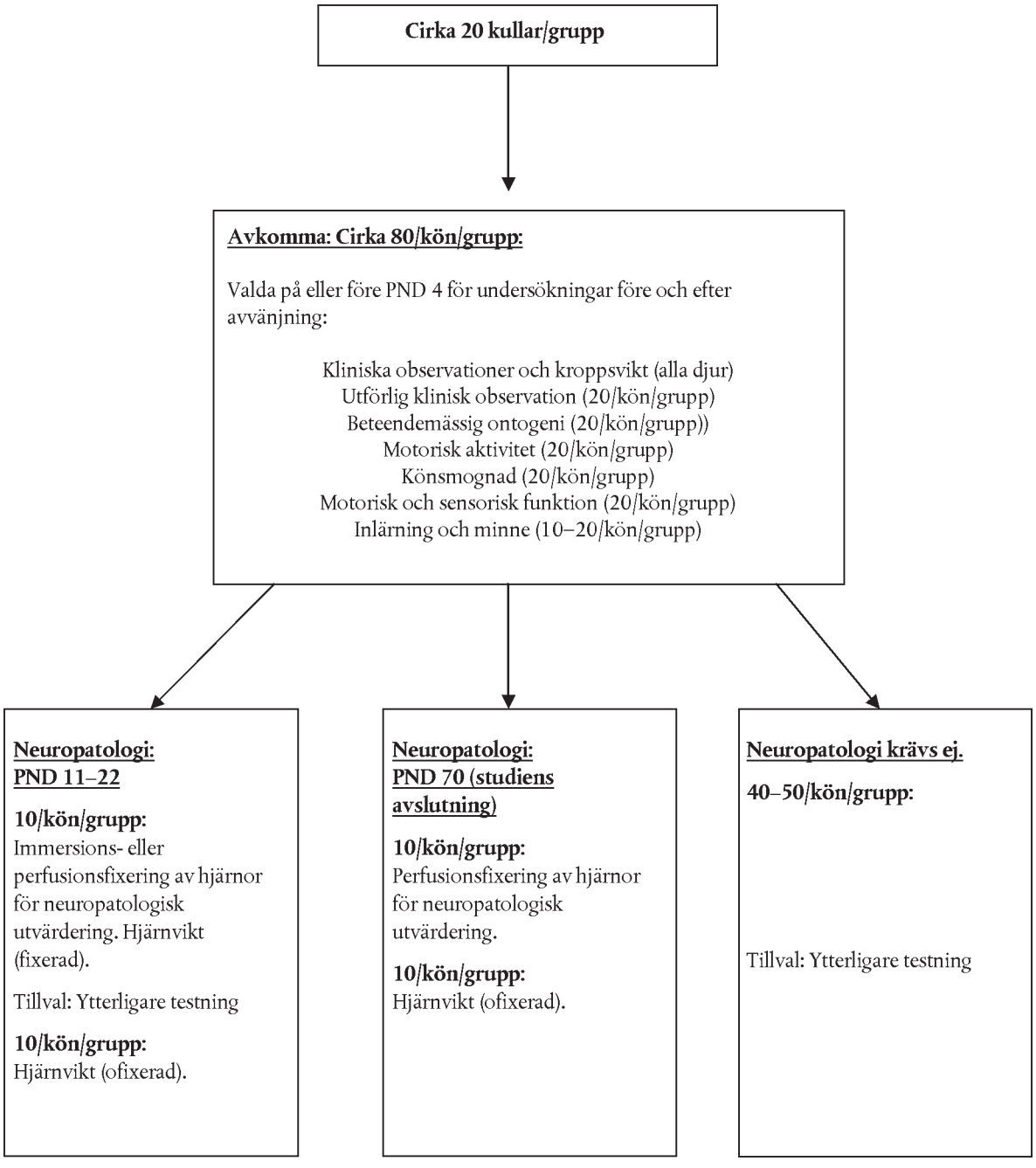
108. Holson, R.R., Freshwater, L., Maurissen, J.P.J., Moser, V.C., and Phang, W. (2008) Statistical issues and techniques appropriate for developmental neurotoxicity testing: a report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints. *Neurotoxicology 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

Allmänt testschema för funktions- och beteendetester, neuropatologisk utvärdering samt hjärnvikter. Detta diagram baseras på beskrivningen i punkterna 13–15 (PND = postnatal dag). Exempel på anvisning av djur finns i tillägg 1



▼M5

Tillägg 1

1. Exempel på möjliga anvisningar av försöksdjur beskrivs och visas i tabellform nedan. Dessa exempel ges för att visa att anvisning av djur till olika testparadigm kan åstadkommas på flera olika sätt.

Exempel 1

2. En uppsättning av 20 ungar/kön/dosnivå (dvs. 1 hane och 1 hona per kull) används för testning av beetendeontogeni före avvänjningen. Av dessa djur avlivas 10 ungar/kön/dosnivå (dvs. 1 hane eller 1 hona per kull) humant på PND 22. Hjärnorna avlägsnas, vägs och bereds för histopatologisk utvärdering. Dessutom samlas hjärnviktsdata in från de ej fixerade hjärnorna från de återstående 10 hanarna och 10 honorna per dosnivå.

3. Ytterligare en uppsättning av 20 djur/kön/dosnivå (dvs. 1 hane och 1 hona per kull) används för funktions-/beteendetester efter avvänjningen (detaljerade kliniska observationer, motorisk aktivitet, plötsliga ljud och kognitiv funktionstestning av unga djur) samt bedömning av ålder för könsmognad. Av dessa djur sövs och fixeras 10 djur/kön/dosnivå (dvs. 1 hane och 1 hona per kull) genom perfusion vid studiens avslutning (cirka PND 70). Efter ytterligare fixering in situ, tas hjärnan ut och bereds för en neuropatologisk utvärdering.

4. För kognitiva funktionstester av unga vuxna (t.ex. PND 60–70) används en tredje uppsättning av 20 ungar/kön/dosnivå (dvs. 1 hane och 1 hona per kull). Av dessa djur avlivas 10 djur/kön/grupp (1 hane och 1 hona per kull) vid studiens avslutning och hjärnan avlägsnas och vägs.

5. Återstående 20 djur/kön/grupp reserveras för eventuella ytterligare test.

Tabell 1

Unge nr [a]		Antal ungar anvisade till test	Undersökning/test
m	f		
1	5	20 m + 20 f	Beteendeontogeni
		10 m + 10 f	PND 22 hjärnvikt/neuropatologi/morfometri
		10 m + 10 f	PND 22 hjärnvikt
2	6	20 m + 20 f	Detaljerade kliniska observationer
		20 m + 20 f	Motorisk aktivitet
		20 m + 20 f	Könsmognad
		20 m + 20 f	Motoriska och sensoriska funktioner
		20 m + 20 f	Inlärning och minne (PND 25)
		10 m + 10 f	Unga vuxna hjärnvikt/neuropatologi/morfometri ~ PND 70

▼M5

Unge nr ([a])		Antal ungar anvisade till test	Undersökning/test
m	f		
3	7	20 m + 20 f	Inlärning och minne (unga vuxna)
		10 m + 10 f	Unga vuxna hjärnvikt ~ PND 70
4	8	—	Reservdjur till utbyten eller ytterligare tester

([a]) I detta exempel gallras kullarna till 4 hanar + 4 honor, hanungarna numreras från 1 till 4, honungarna från 5 till 8.

Exempel 2

6. En uppsättning av 20 ungar/kön/dosnivå (dvs. 1 hane och 1 hona per kull) används för testning av beetendeontogeni före avvänjningen. Av dessa djur avlivas 10 ungar/kön/dosnivå (1 hane eller 1 hona per kull) humant på PND 11. Hjärnorna avlägsnas, vägs och bereds för en histopatologisk utvärdering.

7. Ytterligare en uppsättning av 20 djur/kön/dosnivå (1 hane och 1 hona per kull) används för undersökningar efter avvänjningen (detaljerade kliniska observationer, motorisk aktivitet, åldersbedömning av könsmognad samt motoriska och sensoriska funktioner). Av dessa djur sövs och fixeras 10 djur/kön/dosnivå (dvs. 1 hane och 1 hona per kull) genom perfusion vid studiens avslutning (cirka PND 70). Efter ytterligare fixering *in situ*, tas hjärnan ut, vägs och bereds för en neuropatologisk utvärdering.

8. För kognitiv funktionstestning av ungdjur och unga vuxna används 10 ungar/kön/dosnivå (dvs. 1 hane och 1 hona per kull). Olika djur används för kognitiva funktionstester på PND 23 och unga vuxna. Vid avslutningen avlivas de 10 djur/kön/ grupp som testades som vuxna, och hjärnan avlägsnas och vägs.

9. De återstående 20 djur/kön/grupp som inte valts ut för testning avlivas och kasseras vid avvänjningen.

Tabell 2

Unge nr ([a])		Antal ungar anvisade till test	Undersökning/test
m	f		
1	5	20 m + 20 f	Beteendeontogeni
		10 m + 10 f	PND 11 hjärnvikt/neuropatologi/ morfometri
2	6	20 m + 20 f	Detaljerade kliniska observationer
		20 m + 20 f	Motorisk aktivitet
		20 m + 20 f	Könsmognad
		20 m + 20 f	Motoriska och sensoriska funktioner
		10 m + 10 f	Unga vuxna hjärnvikt/neuropatologi/morfometri ~ PND 70

▼**M5**

Unge nr ([a])		Antal ungar anvisade till test	Undersökning/test
m	f		
3	7	10 m + 10 f ([b])	Inlärning och minne (PND 23)
3	7	10 m + 10 f ([b])	Inlärning och minne (unga vuxna) Unga vuxna hjärnvikt
4	8	—	Djur som avlivas och kasseras PND 21

([a]) I detta exempel gallras kullarna till 4 hanar + 4 honor, hanungarna numreras från 1 till 4, honungarna från 5 till 8.
([b]) Olika ungar används för kognitiva tester på PND 23 och för unga vuxna (t.ex. jämna/udda kullar av totalt 20).

Exempel 3

10. En uppsättning av 20 ungar/kön/dosnivå (dvs. 1 hane och 1 hona per kull) används för bedömning av hjärnvikt och neuropatologi på PND 11. Av dessa djur avlivas 10 ungar/kön/dosnivå (dvs.1 hane och 1 hona per kull) humant på PND 11 och hjärnorna avlägsnas, vägs och bereds för en histopatologisk utvärdering. Dessutom samlas hjärnviktsdata in från de ej fixerade hjärnorna från de återstående 10 hanarna och 10 honorna per dosnivå.

11. Ytterligare en uppsättning av 20 djur/kön/dosnivå (dvs. 1 hane och 1 hona per kull) används för undersökningar av beteendeontogeni (motorisk aktivitet) efter avvänjningen (motorisk aktivitet och bedömning av ålder för könsmognad) samt testning av kognitiv funktion hos ungdjur.

12. Ytterligare en uppsättning av 20 djur/kön/dosnivå (dvs. 1 hane och 1 hona per kull) används för motoriska och sensoriska funktionstester (plötsliga ljud) och detaljerade kliniska observationer. Av dessa djur sövs och fixeras 10 djur/kön/dosnivå (dvs. 1 hane och 1 hona per kull) genom perfusion vid studiens avslutning (cirka PND 70). Efter ytterligare fixering *in situ*, tas hjärnan bort, vägs och bereds för en neuropatologisk utvärdering.

13. Ytterligare en uppsättning av 20 ungar/kön/dosnivå används för testning av kognitiv funktion hos unga vuxna (dvs. 1 hane och 1 hona per kull). Av dessa avlivas 10 djur/kön/grupp (dvs. 1 hane och 1 hona per kull) vid avslutningen, och hjärnan avlägsnas och vägs.

Tabell 3

Unge nr ([a])		Antal ungar anvisade till test	Undersökning/test
m	f		
1	5	10 m + 10 f	PND 11 hjärnvikt/neuropatologi/morfometri
		10 m + 10 f	PND 11 hjärnvikt
2	6	20 m + 20 f	Beteendeontogeni (motorisk aktivitet)
		20 m + 20 f	Motorisk aktivitet
		20 m + 20 f	Könsmognad
		20 m + 20 f	Inlärning och minne (PND 27)

▼**M5**

Unge nr [a]		Antal ungar anvisade till test	Undersökning/test
m	f		
3	7	20 m + 20 f	Plötsliga ljud (ungdjur och unga vuxna)
		20 m + 20 f	Detaljerade kliniska observationer
		10 m + 10 f	Unga vuxna hjärnvikt/neuropatologi/morfometri ~ PND 70
4	8	20 m + 20 f	Inlärning och minne (unga vuxna)
		10 m + 10 f	Unga vuxna hjärnvikt

[a] I detta exempel gallras kullarna till 4 hanar + 4 honor, hanungarna numreras från 1 till 4, honungarna från 5 till 8.

▼**M5**

Tillägg 2

Definitioner

kemikalie: Ett ämne eller en blandning.

testkemikalie: Alla ämnen eller blandningar som testas med denna testmetod.

▼M5

B.54 UTEROTROF BIOASSAY PÅ GNAGARE: ETT KORTTIDS-SCREENINGTEST FÖR ÖSTROGENA EGENSKAPER

INLEDNING

1. Denna testmetod motsvarar OECD:s testriktlinje (TG) 440 (2007). OECD inledde en högprioriterad verksamhet under 1998 för att se över befintliga riktlinjer och ta fram nya riktlinjer för screening och testning av potentiellt hormonstörande ämnen (se hänvisning 1). En del av verksamheten var att ta fram en riktlinje för den uterotrofa bioassayen på gnagare. Den uterotrofa bioassayen på gnagare undergick då ett omfattande valideringsprogram, inklusive sammanställandet av ett detaljerat bakgrundsdokument (se hänvisning 2, 3) och genomförandet av omfattande studier inom och mellan laboratorier för att visa testets relevans och reproducerbarhet med en potent referensöstrogen, svaga östrogenreceptoragonister, en stark östrogenreceptorantagonist och en negativ referenskemikalie (se hänvisning 4, 5, 6, 7, 8, 9). Denna testmetod B.54 är resultatet av de erfarenheter som vunnits under valideringen av testprogrammet och de resultat som erhållits därigenom med östrogena agonister.

2. Den uterotrofa bioassayen är ett korttidsscreeningtest som har sitt ursprung på 1930-talet (se hänvisning 27, 28) och som först standardiserades för screening av en expertkommitté 1962 (se hänvisning 32, 35). Den baseras på ökningen av livmodervikt eller uterotrof respons (för översikt, se hänvisning 29). Den utvärderar en testkemikalies möjlighet att framkalla biologiska aktiviteter som är förenliga med agonister eller antagonister för naturliga östrogener (t.ex. 17-ß-östradiol), dock används den inte lika ofta för att upptäcka antagonister som för agonister. Livmodern svarar på östrogen på två sätt. En första reaktion är viktökning på grund av vattenupptag. Detta följs av viktökning på grund av vävnadstillväxt (se hänvisning 30). Livmoderns reaktion hos råttor och möss är kvalitativt jämförbara.

3. Denna bioassay tjänar som ett *in vivo*-screeningtest och dess tillämpning bör ses mot bakgrund av ”OECD:s konceptuella ram för testning och bedömning av endokrinstörande kemikalier” (tillägg 2). I denna konceptuella ram ingår den uterotrofa bioassayen i nivå 3 som ett *in vivo*-test som ger data om en enda endokrin mekanism, dvs. östrogenicitet.

4. Den uterotrofa bioassayen är avsedd att ingå i en serie *in vitro*- och *in vivo*-tester för att identifiera kemikalier med potential att interagera med det endokrina systemet, vilket slutligen leder till riskbedömningar för människors hälsa eller miljön. OECD:s valideringsprogram använder både starka och svaga östrogenagonister för att utvärdera metodens prestanda att identifiera östrogena kemikalier (se hänvisning 4, 5, 6, 7, 8). Därigenom visades att metodens känslighet när det gäller östrogenagonister var god, vid sidan av en god reproducerbarhet inom och mellan laboratorier.

5. När det gäller negativa kemikalier, så ingick bara en enda ”negativ” referenskemikalie som redan rapporterats negativ genom uterotrof bioassay samt *in vitro*-receptorbindning och receptortest i valideringsprogrammet, men ytterligare testdata, som inte är relaterade till OECD:s valideringsprogram, har utvärderats, vilket ger ytterligare stöd till den särskilda karaktären hos den uterotrofa bioassayen för screening av östrogenagonister (se hänvisning 16).

▼M5

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN OCH BEGRÄNSNINGAR

6. Östrogenagonister och -antagonister verkar som ligander för östrogenreceptorerna a och b och kan aktivera respektive inhibera receptorernas transkriptionella verkan. Detta har potentialen att leda till negativa hälsorisker, inklusive reproduktions- och utvecklingseffekter. Därför föreligger behovet av att snabbt bedöma och utvärdera en kemikalie som en möjlig östrogenagonist eller -antagonist. Affiniteten hos en ligand för en östrogenreceptor eller en transkriptionell aktivering av rapportörgener *in vitro* är informativ men den är bara en av flera faktorer som är avgörande för eventuella risker. Andra bestämningsfaktorer kan omfatta metabolisk aktivering och avaktivering vid införandet i kroppen, fördelning till målgruppsvävnader samt utträde ur kroppen, beroende, åtminstone delvis, på administreringsväg och kemikalien som testas. Detta medför att det är nödvändigt att granska en kemikalies möjliga aktivitet *in vivo* enligt tillämpliga villkor, såvida inte kemikaliens egenskaper vad gäller absorption, distribution, metabolism och eliminering (Adme) redan ger lämplig information. Livmodervävnader svarar med snabb och kraftig tillväxt vid östrogenstimulering, särskilt hos laboratoriegnagare då brunstcykeln varar cirka 4 dagar. Gnagare, framför allt råtta, är också vanliga i toxicitetsstudier för riskbedömning. Därför är gnagares livmoder ett lämpligt målorgan för *in vivo*-screeningen av östrogenagonister och -antagonister.

7. Denna testmetod baseras på de protokoll som används i OECD:s valideringsstudie som har visat sig vara tillförlitlig och repeterbar i studier inom och mellan laboratorier (se hänvisning 5, 7). För närvarande finns det två metoder tillgängliga, en metod med ovariektomerade vuxna honor (OVX-adultmetod) och en metod med ej ovariektomerade omogna honor (immaturmetod). Det visades i OECD:s valideringstestprogram att båda metoderna har jämförbar känslighet och reproducerbarhet. Immaturmetoden är dock något mindre specifik eftersom den har en intakt hypotalamus-hypofys-gonad-axel (HPG-axeln), men den täcker ett större undersökningsområde än ovariektomerade djur eftersom den kan reagera på kemikalier som interagerar med HPG-axeln och inte bara med östrogenreceptorn. Råttans HGP-axel är funktionell när djuret är ca 15 dygn gammalt. Dessförinnan kan puberteten inte påskyndas med behandlingar som GnRH. Allteftersom honorna börjar nå puberteten, före vaginal öppning, har honan flera tysta cykler som inte resulterar i vaginal öppning eller ägglossning men där det finns vissa hormonella svängningar. Om en kemikalie stimulerar HPG-axeln direkt eller indirekt leder det till tidig pubertet, tidig ägglossning och påskyndad vaginal öppning. Det är inte bara kemikalier som verkar på HPG-axeln som leder till detta, utan vissa typer av föda med högre metaboliserbara energinivåer än andra stimulerar tillväxten och påskyndar vaginal öppning utan att vara östrogena. Sådana kemikalier framkallar inte en uterotrof respons hos ovariektomerade vuxna djur eftersom deras HPG-axel inte fungerar.

8. Av djurskyddsskäl bör företräde ges till den metod som använder omogna råttor, undviker kirurgisk förbehandling av djuren samt även undviker en eventuell icke-användning av de djur som visar eventuella tecken på brunst (se hänvisning 30).

▼M5

9. Den uterotrofa responsen är inte helt och hållet av östrogent ursprung, dvs. andra kemikalier än agonister eller antagonister av östrogener kan också ge en respons. Exempelvis kan relativt höga doser av progesteron, testosteron eller olika syntetiska progestiner alla leda till en stimulerande respons (se hänvisning 30). Eventuell respons kan analyseras histologiskt för keratinisering och förhorning av vaginan (se hänvisning 30). Oavsett det möjliga ursprunget till responsen, bör ett positivt utfall av en uterotrof bioassay normalt initiera åtgärder för vidare utredning. Ytterligare bevis på östrogenicitet kan komma från *in vitro*-metoder, såsom ER-bindnings- och transkriptionsaktiveringstesterna, eller från andra *in vivo*-metoder såsom honligt pubertetstest.

10. Med beaktande av att den uterotrofa bioassayen tjänar som ett *in vivo*-screeningtest, tog valideringsstrategin både hänsyn till djurens välbefinnande och fungerade som en strategi för stegvis testning. För detta ändamål riktades ansträngningarna mot att noggrant validera reproducerbarheten och känsligheten hos östrogenicitet – det största problemet för många kemikalier, medan liten ansträngning riktades mot antiöstrogenicitetskomponenten i testet. Endast ett antiöstrogen med kraftig aktivitet testades, eftersom antalet kemikalier med en tydlig antiöstrogen profil (som inte skyms av någon östrogen aktivitet) är mycket begränsad. Denna testmetod är således avsedd för det östrogena protokollet, medan protokollet som beskriver testets antagonistläge ingår i ett vägledningsdokument (se hänvisning 37). Testets reproducerbarhet och känslighet för kemikalier med uteslutande antiöstrogen aktivitet kommer att definieras tydligare längre fram, efter det att testförfarandet har använts rutinmässigt under en tid och fler kemikalier med detta verkningssätt har identifierats.

11. Alla djurbaserade förfaranden ska uppfylla lokala normer för djurskötsel. De beskrivningar av vård och behandling som anges nedan är minimala prestandakrav som kommer att ersättas av lokala föreskrifter som t.ex. Europaparlamentets och rådets direktiv 2010/63/EU av den 22 september 2010 om skydd av djur som används för vetenskapliga ändamål (se hänvisning 38). Ytterligare vägledning om human behandling av djur finns i OECD (se hänvisning 25).

12. Som med alla tester som använder sig av levande djur är det viktigt att se till att uppgifterna verkligen är nödvändiga innan testet påbörjas. Två förhållanden där data kan krävas är:

— Hög exponeringspotential (nivå 1 i den konceptuella ramen, tillägg 2) eller indikationer på östrogenicitet (nivå 2) för att undersöka om sådana effekter kan uppstå *in vivo*.

— Effekter som indikerar östrogenicitet i *in vivo*-tester på nivå 4 eller 5, för att styrka att effekterna var relaterade till en östrogen mekanism som inte kan belysas med hjälp av ett *in vitro*-test.

13. Definitioner som används i denna testmetod finns i tillägg 1.

▼M5

PRINCIP FÖR TESTMETODEN

14. Den uterotrofa bioassayen förlitar sig på känsligheten hos ett djurtestsystem där hypotalamus-hypofys-ovarie-axeln inte är funktionell, vilket leder till låga endogena nivåer av cirkulerande östrogen. Detta säkerställer en låg livmoderreferensvikt och ett maximalt responsområde för administrerade östrogener. Två östrogenkänsliga tillstånd hos hongnagare uppfyller detta krav:

i) Omogna honor efter avvänjning och före puberteten och

ii) unga vuxna honor efter ovariektomi med tillräcklig tid för livmodervävnaden att gå i regress.

15. Testkemikalien tillförs dagligen via sondmatning eller subkutan injektion. Stegvisa testkemikaliedoser ges till minst två behandlingsgrupper av försöksdjur (se punkt 33 för vägledning), med en dosnivå per grupp, och för immaturmetoden en administreringsperiod av tre på dagar i följd och för OVX-adultmetoden en administreringsperiod av minst tre dagar i följd. Djuren obduceras cirka 24 timmar efter sista dosen. För östrogenagonister utvärderas medelvärdet för livmodervikten hos de behandlade djurgrupperna i förhållande till vehikelgruppen avseende en statistiskt signifikant ökning. En statistiskt signifikant ökning av den genomsnittliga livmodervikten hos en testgrupp visar en positiv respons i denna bioassay.

BESKRIVNING AV METODEN

Val av djurart

16. Vanligen använda stammar av laboratoriegnagare kan användas. Till exempel användes Sprague-Dawley- och Wistar-råttstammar vid valideringen. Stammar med en livmoder som är eller misstänks vara mindre känslig bör inte användas. Laboratoriet bör påvisa känslighet hos den stam som används, enligt beskrivningen i punkt 26 och 27.

17. Råtta och mus har rutinmässigt använts för den uterotrofa bioassayen sedan 1930-talet. OECD:s valideringsstudier har endast utförts med råttor, grundat på en förståelse för att båda arterna bedöms vara likvärdiga och att det därmed bör räcka med en art för den världsomfattande valideringen för att spara resurser och djur. Råttan är den art som används i de flesta studier om reproduktions- och utvecklingstoxicitet. Med hänsyn till att det finns en stor historisk databas för möss och därmed möjlighet att bredda testmetoden för uterotrof bioassay på gnagare och använda möss som testart, har en begränsad uppföljande valideringsstudie genomförts på möss (se hänvisning 16). En överbryggande studie, med ett begränsat antal testkemikalier och deltagande laboratorier och utan kodad provtestning, har valts i enlighet med den ursprungliga avsikten att spara resurser och djur. Denna överbryggande valideringsstudie visar för den uterotrofa bioassayen på unga vuxna ovariektomerade möss att data som erhålls från råttor och möss överensstämmer väl, både kvalitativt och kvantitativt. Resultatet från den uterotrofa bioassayen kan bli inledningen till en långsiktig studie, vilket gör att djur från samma stam och ursprung kan användas i båda försöken. Den överbryggande studien begränsades till OVX-möss och rapporten ger inte en robust datauppsättning för att validera immaturmodellen, och därför beaktas inte immaturmodellen för möss i denna testmetod.

▼M5

18. Således kan, i vissa fall, möss användas i stället för råttor. En motivering bör ges för denna art baserat på toxikologiska, farmakokinetiska och/eller andra kriterier. Ändringar i protokollet kan bli nödvändigt för möss. Till exempel är foderkonsumtionen hos möss i förhållande till kroppsvikt högre än den hos råttor och därför bör innehållet av fytoöstrogen i fodret vara lägre för möss än för råttor (se hänvisning 9, 20, 22).

Inhysnings- och utfodringsförhållanden

19. Alla förfaranden bör överensstämma med lokala normer för laboratoriedjurvård. Dessa beskrivningar av vård och behandling är minimikrav och ersätts av lokala föreskrifter som t.ex. Europaparlamentets och rådets direktiv 2010/63/EU av den 22 september 2010 om skydd av djur som används för vetenskapliga ändamål (se hänvisning 38). Temperaturen i djurutrymmet bör vara 22 °C (med ett ungefärligt intervall på ± 3 °C). Den relativa fuktigheten bör vara minst 30 % och bör helst inte överstiga 70 %, utom när rummet rengörs. Målet bör vara relativ luftfuktighet på 50–60 %. Artificiell belysning bör användas. Den dagliga belysningssekvensen bör vara 12 timmar ljus, 12 timmar mörker.

20. Djuren ska ha fri tillgång till laboratoriefoder och dricksvatten. Unga vuxna djur kan inhysas individuellt eller i burar om grupper på upp till tre djur. På grund av de omogna djurens låga ålder rekommenderas social gruppinhysning.

21. Höga nivåer av fytoöstrogener i laboratoriefoder har varit kända för att öka livmodervikterna tillräckligt mycket hos gnagare för att störa den uterotrofa bioassayen (se hänvisning 13, 14, 15). Höga nivåer av fytoöstrogener och omsättbar energi i laboratoriefoder kan också leda till tidig pubertet om omogna djur används. Förekomsten av fytoöstrogener kommer främst från soja och alfalfaprodukter som tillförts laboratoriefodret, och koncentrationer av fytoöstrogener har visat sig variera mellan olika partier av standardlaboratoriefoder (se hänvisning 23). Kroppsvikt är en viktig variabel, eftersom den mängd livsmedel som konsumeras är relaterad till kroppsvikten. Därför kan den faktiska fytoöstrogendosen som konsumeras genom samma foder variera mellan arter och åldrar (se hänvisning 9). För omogna honråttor kan foderkonsumtionen på grundval av kroppsvikten vara ungefär dubbelt så stor som hos ovariektomerade unga vuxna honor. För unga vuxna möss kan foderkonsumtionen på grundval av kroppsvikten vara ungefär fyrdubblad som den för ovariektomerade unga vuxna honråttor.

22. Resultat från den uterotrofa bioassayen (se hänvisning 9, 17, 18, 19) visar dock att begränsade mängder fytoöstrogener i fodret är acceptabla och minskar inte bioassayens känslighet. Som en vägledning bör nivåerna av fytoöstrogener i fodret inte överstiga 350 µg genisteinekvivalenter/gram laboratoriefoder för omogna Sprague Dawley- och Wistar-honråttor (se hänvisning 6, 9). Sådant foder bör också vara lämplig vid testning av unga vuxna ovariektomerade råttor, eftersom foderkonsumtionen på basis av kroppsvikten är mindre hos unga vuxna jämfört med omogna djur. Om vuxna ovariektomerade möss eller mer fytoöstrogenkänsliga råttor används, måste en proportionell minskning av fytoöstrogennivåerna i fodret övervägas (se hänvisning 20). Dessutom kan skillnader i tillgänglig metabolisk energi för olika typer av föda leda till tidsförskjutning av pubertetsdebuten (se hänvisning 21, 22).

▼M5

23. Ett noggrant val av foder utan förhöjda nivåer av fytoöstrogener (för vägledning, se hänvisning 6, 9) eller omsättbar energi, som kan påverka resultaten (se hänvisning 15, 17, 19, 22, 36), krävs före studien. Att säkerställa ett korrekt utförande av det testsystem som används på laboratoriet enligt punkterna 26 och 27 är en viktig kontroll av båda dessa faktorer. Som en säkerhetsåtgärd enligt god laboratoriesed (GLP) bör representativ provtagning av varje parti av foder som tillförs under studien utföras för eventuell analys av fytoöstrogeninnehållet (t.ex. vid hög livmoderkontrollvikt i förhållande till historiska kontroller, eller en otillräcklig respons på referensöstrogen, 17-alfa-etinylestradiol). Alikvoter ska analyseras som en del av studien eller frysas vid – 20 °C eller på sådant sätt att provet inte bryts ned i väntan på analys.

24. Vissa strömaterial kan innehålla naturligt förekommande östrogena eller antiöstrogena kemikalier (t.ex. är majskolvar kända för att påverka cykliciteten hos råttor och förefaller vara antiöstrogena). Det valda ströet bör ha en minimal halt av fytoöstrogener.

Förberedelse av djuren

25. Försöksdjur utan tecken på sjukdom eller fysiska abnormiteter väljs slumpmässigt ut för placering i kontroll- och behandlingsgrupperna. Burarna bör placeras så att eventuella effekter beroende på placering blir så små som möjligt. Djuren bör identifieras unikt. Helst bör omogna djur placeras i bur tillsammans med moderdjur eller fostermoderdjur fram till avvänjningen under acklimatiseringen. Acklimatiseringsperioden före studiens start bör vara ca 5 dagar för unga vuxna djur och omogna djur som levererats tillsammans med moderdjur eller fostermoderdjur. Om omogna djur erhålls som avvanda utan moderdjur kan det vara nödvändigt att förkorta acklimatiseringsperioden eftersom doseringen bör inledas omedelbart efter avvänjningen (se punkt 29).

FÖRFARANDE

Kvalifikationsprövning av laboratorium

26. Två olika alternativ kan användas för att kvalitetspröva laboratorier:

— Återkommande kontroller eller förlita sig på en inledande positiv grundkontrollstudie (se punkt 27). Minst var 6:e månad och varje gång det sker en förändring som kan påverka utförandet av testet (t.ex. en ny beredning av foder, byte av personal som utför dissektioner, förändringar av djurstam eller leverantör, etc.), bör känsligheten hos testsystemet (djurmodell) verifieras med en lämplig dos (baserat på den inledande positiva grundkontrollstudien beskriven i punkt 27) av ett referensöstrogen: 17a-etinylestradiol (CAS-nr 57-63-6) (EE).

— Användning av jämsides behandlade kontroller genom att inkludera en grupp som tillförs en lämplig dos av referensöstrogen i varje test.

Om systemet inte svarar som förväntat bör försöksbetingelserna granskas och ändras i enlighet därmed. Det rekommenderas att dosen av referensöstrogen som används i båda fallen bör vara ungefär ED 70 till 80.

▼M5

27. **Positiv grundkontrollstudie** – Innan ett laboratorium genomför en undersökning enligt denna testmetod för första gången bör laboratoriets kompetens visas i ett test av djurmodellens respons genom fastställande av dosresponsen för ett referensöstrogen: 17a-etinylestradiol (CAS-nr 57-63-6) (EE) med minst fyra doser. Livmoderviktsresponsen kommer att jämföras med etablerade historiska data (se hänvisning 5). Om denna positiva grundkontrollstudie inte ger förväntade resultat bör försöksbetingelserna granskas och ändras.

Djurens antal och skick

28. Varje behandlad grupp och kontrollgrupp bör innehålla minst 6 djur (protokoll för både immatur- och OVX-adultmetod).

Ålder på omogna djur

29. För den uterotrofa bioassayen med omogna djur måste födelsedatum anges. Doseringen bör starta tillräckligt tidigt för att säkerställa, i slutet av tillförseln av testkemikalien, att den fysiologiska ökningen av endogena östrogener som sammanhänger med puberteten ännu inte har ägt rum. Å andra sidan finns det belägg för att mycket unga djur kan vara mindre känsliga. För att definiera optimal ålder bör varje laboratorium ta sina egna bakgrundsdata om mognad i beaktande.

Som en allmän vägledning kan doseringen av råttor påbörjas omedelbart efter tidig avvänjning på postnatal dag 18 (postnatal dag 0 är födelsedatum). Doseringen av råttor bör helst vara avslutad på postnatal dag 21 men i alla händelser före postnatal dag 25, eftersom hypotalamus-hypofys-ovarie-axeln blir funktionell efter den åldern och endogena östrogennivåer kan börja stiga vilket leder till en ökning av referensmedelvärden för livmodervikt och gruppens standardavvikelser (se hänvisning 2, 3, 10, 11, 12).

Förfarande för ovariektomi

30. För ovariektomerad honråtta och honmus (behandlings- och kontrollgrupper) bör ovariektomin ske mellan 6 och 8 veckors ålder. För råttor bör minst 14 dagar förflyta mellan ovariektomin och den första dagen för tillförseln så att livmodern går i regress till en minimal, stabil referensnivå. För möss bör åtminstone 7 dagar förflyta mellan ovariektomin och tillförselns första dag. Eftersom små mängder av äggstocksvävnad är tillräckliga för att ge betydande cirkulerande nivåer av östrogen (se hänvisning 3), bör djuren testas före användningen genom att prov av epitelceller från vagina observeras minst fem dagar i följd (t.ex. dag 10–14 efter ovariektomin för råttor). Om djuren visar tecken på brunst bör de inte användas. Vid obduktionen bör äggstocksresterna undersökas avseende eventuella tecken på äggstocksvävnad. Om så är fallet bör djuret inte tas med i beräkningarna (se hänvisning 3).

31. Ovariektomiproceduren inleds med djuret placerat i ventral halvliggande ställning, efter att djuret har blivit ordentligt bedövat. Snittet som öppnar den dorsolaterala bukväggen bör vara ca 1 cm på längden vid mittpunkten mellan revbensbroskets undre kant och höftbenskammen, och några millimeter i sidled fram till den laterala kanten på ryggmuskeln. Äggstockarna bör tas ut ur bukhålan till ett aseptiskt underlag. Äggstockarna bör lossas vid förbindelsen mellan äggledaren och livmodern. Efter att ha bekräftat att ingen massiv blödning sker, bör bukväggen tillslutas med en sutur och huden tillslutas med autoclips eller lämplig sutur. Ligaturpunkterna visas schematiskt i figur 1. Lämplig postoperativ smärtlindring bör användas i enlighet med rekommendationer från en veterinär med erfarenhet av gnagarvård.

▼M5

Kroppsvikt

32. För OVX-adultmetoden är kroppsvikt och livmodervikt inte korrelerade eftersom livmodervikten påverkas av hormoner som östrogen, men inte av tillväxtfaktorer som reglerar kroppsstorleken. Däremot är kroppsvikten relaterad till livmoderns vikt i immaturmodellen, samtidigt som den mognar (se hänvisning 34). Således bör, vid början av studien, viktskillnaden mellan djuren som används i immaturmodellen vara minimal och inte överstiga ± 20 % av medelvikten. Detta innebär att uppfödaren bör standardisera kullstorleken, för att säkerställa att avkomman från olika moderdjur kommer att matas ungefär likadant. Djuren bör anvisas till grupper (både kontroll- och behandlingsgrupper) genom slumpmässig viktfördelning, så att medelvärdet för kroppsvikten i varje grupp inte statistiskt skiljer sig åt från andra grupper. Man bör överväga att undvika anvisning av kullsyskon till samma behandlingsgrupp, så vitt det är möjligt, utan att öka antalet kullar som ska användas för undersökningen.

Dosering

33. För att fastställa huruvida en testkemikalie kan ha östrogen aktivitet *in vivo* är normalt två dosgrupper och en kontrollgrupp tillräckliga, och denna utformning är därför att föredra av djurskyddsskäl. Om syftet är att antingen erhålla en dos-responskurva eller att extrapolera till lägre doser, behövs minst 3 dosgrupper. Om information utöver identifiering av östrogen aktivitet (t.ex. en uppskattning av potens) krävs, bör ett annat doseringsschema övervägas. Med undantag av behandlingen med testkemikalien bör djuren i kontrollgruppen hanteras på exakt samma sätt som i testgruppen. Om en vehikel används för tillförsel av testkemikalien bör kontrollgruppen tillföras samma mängd vehikel som används i de behandlade grupperna (eller den största volym som används i testgrupperna om detta skiljer sig åt mellan grupperna).

34. Målet för den uterotrofa bioassayen är att välja doser som garanterar djurens överlevnad och som inte orsakar signifikant toxicitet eller lidande hos djuren, efter tre dagar i följd med tillförsel av kemikalien upp till en maximal dos på 1 000 mg/kg/dag. Alla dosnivåer bör väljas med hänsyn till eventuella toxicitetsdata och (toxiko-)kinetiska data som finns tillgängliga om testkemikalien eller närbesläktade ämnen. Den högsta dosen bör ta hänsyn till LD 50 och/eller information om akut toxicitet för att undvika dödsfall, svår smärta och lidande hos djuren (se hänvisning 24, 25, 26). Den högsta dosen bör motsvara maximal tolererbar dos (MTD). En studie som genomförs vid en dosnivå som framkallar en positiv uterotrof respons accepteras också. Som en screening är breda intervall (t.ex. halva logenheter som motsvarar en dosprogression på 3,2 eller till och med upp till en logenhet) mellan doseringarna i allmänhet godtagbara. Om det inte finns några lämpliga data tillgängliga kan en dosfinnande studie genomföras som hjälp för att bestämma vilka doser som ska användas.

35. Alternativt, om den östrogena potensen hos en agonist kan uppskattas genom *in vitro*-data (eller datormodeller) kan dessa beaktas vid valet av dos. Exempelvis kan mängden testkemikalie som skulle framkalla en uterotrof respons som är likvärdig med referensagonisten (etinylestradiol) uppskattas genom dess relativa *in vitro*-potens jämfört med etinylestradiol. Den högsta testdosen ges genom att multiplicera denna ekvivalentdos med en lämplig faktor, t.ex. 10 eller 100.

▼M5

Överväganden för dosfinnande studie

36. Vid behov kan en preliminär dosfinnande studie genomföras med några få djur. För detta ändamål kan man använda OECD:s vägledning nr 19 (se hänvisning 25) som definierar kliniska tecken som tyder på toxicitet eller lidande för djuren. Om det är möjligt inom denna dosfinnande studie kan, efter tre dagars tillförsel, livmodern skäras ut och vägas ca 24 timmar efter att sista dosen getts. Dessa data kan sedan användas vid utformning av huvudstudien (val av en acceptabel största och minsta dos och rekommenderat antal dosgrupper).

Tillförsel av doser

37. Testkemikalien tillförs via sondmatning eller subkutan injektion. Djurskydd såväl som toxikologiska aspekter av betydelse för den mänskliga exponeringsvägen för kemikalien (t.ex. oral sondmatning för att efterlikna förtäring, subkutan injektion för att efterlikna inandning eller hudabsorption), de fysikalisk-kemiska egenskaperna hos testmaterialet och i synnerhet gällande toxikologisk information och data om metabolism och kinetik (t.ex. behovet att undvika första passage-metabolism, större effektivitet via en bestämd rutt) måste tas med i beräkningen när man väljer administrationssätt.

38. Det rekommenderas att i första hand överväga att använda en vattenbaserad lösning/suspension, om det är möjligt. Men eftersom de flesta östrogenligander eller deras metaboliska prekursorer tenderar att vara hydrofoba, är den vanligaste metoden att använda en lösning/suspension i olja (t.ex. majs-, jordnöts-, sesam- eller olivolja). Dessa oljor har olika kaloriinnehåll och fetthalt, sålunda kan vehikeln påverka det totala metaboliserbara energiintaget (ME) och därmed eventuellt förändra uppmätta endpoints såsom livmodervikten, i synnerhet för immaturmetoden (se hänvisning 33). Före studien bör därför alla vehiklar som ska användas testas mot kontroller utan vehiklar. Testkemikalier kan lösas upp i en minimal mängd av 95 % etanol eller annat lämpligt lösningsmedel, och spädas ut till slutliga koncentrationer i testvehikeln. De toxiska egenskaperna hos lösningsmedlet måste vara kända, och bör testas med endast lösningsmedel i en separat kontrollgrupp. Om testkemikalien bedöms vara stabil kan försiktig uppvärmning och kraftig mekanisk påverkan användas för att hjälpa till att lösa upp testkemikalien. Testkemikaliens stabilitet i vehikeln bör bestämmas. Om testkemikalien är stabil under hela studien kan en startalikvot av testkemikalien beredas, och därefter kan de angivna doseringsutspädningarna beredas dagligen.

39. Doseringstidpunkterna beror på den modell som används (se punkt 29 för immaturmodellen och punkt 30 för OVX-adultmodellen). Omogna råttor av honkön doseras dagligen med testkemikalien tre dagar i följd. En tredagars behandling rekommenderas också för ovariektomerade honråttor, men längre exponeringar är acceptabla och kan förbättra upptäckten av svagt aktiva kemikalier. För ovariektomerade honmöss bör tre dagar vara tillräckligt, och det finns inte någon påvisbar fördel med en förlängning på upp till sju dagar för starka östrogenagonister, dock påvisades inte detta förhållande för svaga östrogener i valideringsstudien (se hänvisning 16), alltså bör doseringen förlängas upp till sju dagar i följd för ovariektomerade vuxna möss. Dosen bör ges vid samma tid varje dag. Doserna bör justeras vid behov för att bibehålla en konstant dosnivå i förhållande till djurens kroppsvikt (t.ex. mg av testkemikalien per kg kroppsvikt per dag). När det gäller testvolymen bör dess variationer på grundval av kroppsvikten minimeras, genom justering av koncentrationen i doseringslösningen, för att säkerställa en konstant volym på grundval av kroppsvikten, vid alla dosnivåer och för varje administrationsväg.

▼M5

40. När testkemikalien tillförs genom sondmatning bör detta ske i en daglig engångsdos via magsond eller lämplig intubationskanyl. Den största mängd vätska som kan administreras vid ett tillfälle beror på försöksdjurets storlek. Lokala djurvårdsriktlinjer bör följas, men volymen bör inte överstiga 5 ml/kg kroppsvikt, utom i fråga om vattenlösningar där 10 ml/kg kroppsvikt får användas.

41. När testkemikalien administreras genom subkutan injektion, bör detta ske i en enda daglig dos. Doserna ska ges i dorsoscapular- eller lumbarregionen med en steril nål (t.ex. med grovleken 23 eller 25), och en tuberkulinspruta. Rakning av injektionsstället är valfritt. Eventuell förlust, läckage vid injektionsstället eller ofullständig dosering ska registreras. Den totala volymen som injiceras per råtta per dag bör inte överstiga 5 ml/kg kroppsvikt, uppdelat på 2 injektionsställen, utom i fråga om vattenhaltiga lösningar, där 10 ml/kg kroppsvikt kan användas.

Observationer

Allmänna och kliniska observationer

42. Allmänna kliniska observationer bör göras minst en gång per dag och oftare när tecken på toxicitet observeras. Observationerna bör företrädesvis utföras vid samma tidpunkt varje dag och med hänsyn till förväntade toppeffekter efter doseringen. Alla djur ska observeras avseende dödlighet, sjuklighet och allmänna kliniska tecken, såsom förändringar i beteende, hud, päls, ögon, slemhinnor, förekomst av sekret och utsöndringar samt autonom aktivitet (t.ex. tårflöde, piloerektion, pupillstorlek och ovanligt andningsmönster).

Kroppsvikt och foderkonsumtion

43. Alla djur bör vägas dagligen med en noggrannhet på 0,1 g, med början strax före starten av behandlingen, dvs., när djuren fördelas i grupper. Som en valfri mätning, kan mängden foder som konsumeras under behandlingsperioden mätas per bur genom vägning av fodertrågen. Foderkonsumtionsresultaten bör uttryckas i gram per råtta per dag.

Dissekering och mätning av livmodervikt

44. Råttorna ska avlivas humant tjugofyra timmar efter den sista behandlingen. Helst ska obduktionsordningen randomiseras mellan grupperna för att undvika progression direkt upp eller ner i dosgrupperna, vilket på ett subtilt sätt kan påverka data. Bioassayens mål är att mäta både våt och torr livmodervikt. Den våta vikten inkluderar livmodern och det luminala vätskeinnehållet. Den torra vikten mäts efter att det luminala innehållet i livmodern har angivits och avlägsnats.

45. Före dissektionen granskas vaginan beträffande öppningsstatus hos omogna djur. Dissektionsförfarandet inleds genom att öppna bukväggen med början vid blygdbenssammanfogningen. Sedan lossas livmoderhornet och äggstockarna, om de är kvar, från den dorsala bukväggen. Urinblåsan och urinledarna tas bort från den ventrala och laterala sidan av livmodern och vaginan. Fibrös vidhäftning mellan rektum och vaginan avskiljs tills övergången mellan vaginalöppning och perineal hud kan identifieras. Livmodern och vaginan avskiljs från kroppen genom ett snitt i vaginalväggen precis ovanför förbindelsen mellan perineal hud såsom visas i figur 2. Livmodern avskiljs från kroppsväggen genom att livmoderbandet försiktigt skärs av vid fästpunkten, längs hela längden av den dorsolaterala aspekten av varje

▼M5

livmoderhorn. När livmodern tagits ut ur kroppen bör den hanteras tillräckligt snabbt för att undvika uttorkning av vävnaderna. Viktförluster på grund av uttorkning blir mer betydelsefulla med små vävnader såsom uterus (se hänvisning 23). Om äggstockarna finns kvar så tas äggstockarna bort från äggledarna för att undvika förlust av luminal vätska från livmoderhornet. Om djuret har ovariektomerats så bör resterna undersökas beträffande förekomsten av eventuell äggstocksvävnad. Överflödigt fett och bindväv ska putsas bort. Vaginan tas bort från livmodern precis under livmoderhalsen så att livmoderhalsen förblir i livmodern, såsom visas i figur 2.

46. Varje livmoder bör överföras till en individuellt märkt och vägd behållare (t.ex. en petriskål eller ett vikttråg i plast) med fortsatt omsorg om att undvika uttorkning före vägningen (t.ex. så kan filterpapper som fuktats med saltlösning placeras i behållaren). Livmodern med luminal vätska vägs med en noggrannhet på 0,1 mg (våt livmodervikt).

47. Varje livmoder bearbetas sedan enskilt för att avlägsna luminal vätska. Båda livmoderhornen genomborras eller skärs longitudinellt. Livmodern placeras på lätt fuktat filterpapper (t.ex. Whatman nr 3) och pressas försiktigt med ett andra stycke lätt fuktat filterpapper för att helt avlägsna den luminala vätskan. Livmodern utan luminalt innehåll vägs med en noggrannhet på 0,1 mg (torr livmodervikt).

48. Livmodervikten vid avslutningen kan användas för att säkerställa att lämplig ålder för den omogna intakta råttan inte överskreds, dock är de historiska uppgifterna om råttstammen som används på laboratoriet avgörande i detta hänseende (se punkt 56 för tolkning av resultaten).

Valfria undersökningar

49. Efter vägningen kan livmodern fixeras i 10 % neutral buffrad formalin för att undersökas histopatologiskt efter haematoxylin-eosin-färgning (HE). Vaginan kan undersökas i enlighet därmed (se punkt 9). Dessutom kan morfometriska mätningar av endometriets epitel utföras för en kvantitativ jämförelse.

DATA OCH RAPPORTERING

Data

50. Studiedata bör omfatta

— antalet djur vid testets början,

— antalet och identiteten för de djur som påträffats döda under testet eller som avlivats av humana skäl, samt datum och tid för varje dödsfall eller avlivning,

— antalet och identiteten för de djur som visar tecken på toxicitet och en beskrivning av de tecken på toxicitet som observerats, inklusive tidpunkt för första tecken, varaktighet och hur allvarliga de toxiska effekterna är samt

— antalet och identiteten hos de djur som visar eventuella skador och en beskrivning av typen av skador.

▼M5

51. Individuella försöksdjursdata ska registreras avseende kroppsvikt, våt livmodervikt och torr livmodervikt. Ensidiga statistiska analyser av agonister bör användas för att bestämma huruvida administrering av en testkemikalie resulterade i en statistiskt signifikant ($p < 0,05$) ökning av livmodervikten. Lämpliga statistiska analyser bör utföras för testning avseende behandlingsrelaterade förändringar av torr och våt livmodervikt. Exempelvis kan data utvärderas genom en kovariansanalys (Ancova), med kroppsvikten vid obduktionen som samvariabel. En variansstabiliserande logaritmisk transformation kan utföras på livmoderdata före dataanalysen. Dunnett och Hsus test är lämpliga för att göra parvisa jämförelser mellan varje dosgrupp och vehikelkontroller och för att beräkna konfidensintervallet. Studentiserade residualer kan användas för att upptäcka eventuella avvikande värden och bedöma variansens homogenitet. Dessa förfaranden tillämpades i OECD:s valideringsprogram med hjälp av PROC GLM i Statistical Analysis System (SAS Institute, Cary, NC), version 8 (se hänvisning 6, 7).

52. En slutrapport ska innehålla:

Testanläggning:

— Ansvarig personal och deras studieansvar.

— Data från utgångsvärdet för det positiva kontrolltestet och periodiska positiva kontrolldata (se punkterna 26 och 27)

Testkemikalie:

— Karakterisering av testkemikalier.

— Fysikalisk form och om det är relevant, fysikalisk-kemikaliska egenskaper.

— Metod och frekvens för beredning av utspädningar.

— Eventuella stabilitetsdata som genererats.

— Eventuella analyser av doseringslösningar.

Vehikel:

— Karakterisering av testvehikel (form, leverantör och parti)

— Motivering för val av vehikel (om annan än vatten).

Försöksdjur:

— Art och stam, samt motivering av valet.

— Leverantör och specifik leverantörsanläggning.

— Leveransålder med födelsedatum.

— För omogna djur: uppgift om huruvida de har levererats tillsammans med moderdjur eller fostermoderdjur, samt datum för avvänjningen.

— Uppgifter om djuracklimatiseringsförfarande.

— Antalet djur per bur.

— Detaljer och metod för identifiering av enskilda djur och grupper.

Testbetingelser:

— Uppgifter om randomiseringsprocess (dvs. metoden som använts)

— Motivering för valet av dos.

▼**M5**

— Uppgifter om testkemikaliens sammansättning, dess uppnådda koncentrationer, stabilitet och homogenitet.

— Uppgifter om tillförsel av testkemikalien samt motivering av valet av exponeringsväg.

— Foder (namn, typ, leverantör, innehåll och, om möjligt, fytoöstrogennivåer).

— Vattenkälla (t.ex. kranvatten eller filtrerat vatten) och tillförselsätt (genom slang från en stor behållare, i flaskor, etc.).

— Strö (namn, typ, leverantör, innehåll).

— Registrering av burförhållanden, belysningsintervall, rumstemperatur och luftfuktighet, rengöring.

— Detaljerad beskrivning av obduktion och livmodervägning.

— Beskrivning av statistiska metoder.

Resultat

För enskilda djur:

— Alla dagliga individuella kroppsvikter (från anvisningen till grupper och fram till obduktionen) (med en noggrannhet på 0,1 g).

— Ålder på varje djur (räknat i dagar med födelsedatum som dag 0) när behandlingen med testkemikalien börjar.

— Datum och tid för varje doseringstillfälle.

— Beräknad volym och dos som administreras, samt observationer av eventuella doseringsförluster under eller efter administreringen.

— Daglig dokumentation av djurens status, inklusive relevanta symtom och iakttagelser.

— Misstänkt dödsorsak (om den hittas döende eller död under studien).

— Datum och tid för human avlivning med tidsintervall till sista doseringen.

— Våt livmodervikt (med en noggrannhet på 0,1 mg) och eventuella observationer av förlust av luminal vätska vid dissekering och förberedelser för vägning.

— Torr livmodervikt (med en noggrannhet på 0,1 mg).

För varje grupp av djur:

— Genomsnittliga dagliga kroppsvikter (med noggrannhet på 0,1 g) och standardavvikelser (från anvisningen till grupper till obduktionen).

— Genomsnittlig våt livmodervikt och genomsnittlig torr livmodervikt (med en noggrannhet på 0,1 mg), samt standardavvikelser.

— Daglig foderkonsumtion om den mäts (beräknat som gram foder som konsumeras per djur).

▼M5

— Resultaten av statistiska analyser som jämför både våta och torra livmodervikter i behandlade grupper i förhållande till samma mått i vehikelkontrollgrupperna.

— Resultaten av statistisk analys som jämför den totala kroppsvikten och kroppsviktökning i behandlade grupper i förhållande till samma mått i vehikelkontrollgrupperna.

53. Sammanfattning av de viktigaste vägledningsfakta för testmetoden.

	Råtta	**Möss**
Djur		
Stam	Vanlig laboratoriestam av gnagare	
Antal försöksdjur	Minst 6 djur per dosgrupp	
Antal grupper	Minst 2 testgrupper (se punkt 33 för vägledning) och en negativ kontrollgrupp För vägledning om positiva kontrollgrupper se punkterna 26 och 27	
Inhysnings- och utfodringsförhållanden		
T° i djurutrymmet	22 °C ± 3 °C	
Relativ luftfuktighet	50–60 % och inte under 30 % eller över 70 %	
Daglig belysningssekvens	12 timmar ljus, 12 timmar mörker	
Foder och dricksvatten	Fri tillgång	
Inhysning	Individuellt eller i grupper på upp till tre djur (social gruppinhysning rekommenderas för omogna djur)	
Foder och strö	En låg halt av fytoöstrogener rekommenderas i foder och strö	
Protokoll		
Metod	Ej ovariektomerad immatur-metoden (föredras) Ovariektomerad adult hona-metoden	Ovariektomerad adult hona-metoden
Ålder för dosering av omogna djur	Tidigast PND 18. Doseringen bör vara avslutad före PND 25	Ej relevant inom tillämpningsområdet för den aktuella testmetoden
Ålder vid ovariektomi	Mellan 6 och 8 veckors ålder	
Ålder för dosering av ovariektomerade djur	Minst 14 dagar bör förflyta mellan ovariektomin och 1:a administreringsdagen	Minst 7 dagar bör förflyta mellan ovariektomin och 1:a administreringsdagen
Kroppsvikt	Kroppsviktsvariationen bör vara minimal och inte överstiga ± 20 % av den genomsnittliga vikten	

▼M5

	Råtta	Möss
Dosering		
Administrationssätt	Oral sondmatning eller subkutan injektion	
Administreringsfrekvens	Daglig engångsdos	
Volym för sondmatning och insprutning	≤ 5ml/kg kroppsvikt (eller upp till 10 ml/kg kroppsvikt i fråga om vattenlösningar) (i 2 injektionsställen för subkutan administrering)	
Administreringens varaktighet	3 dagar i följd för immaturmodellen Minst 3 dagar i följd för OVX-modellen	7 dagar i följd för OVX-modellen
Tidpunkt för obduktion	Ungefär 24 timmar efter den sista dosen	
Resultat		
Positiv respons	Statistiskt signifikant ökning av medelvärdet för livmodervikt (våt och/eller torr)	
Referensöstrogen	17α-etinylestradiol	

RIKTLINJER FÖR TOLKNING OCH GODKÄNNANDE AV RESULTATEN

54. I allmänhet bör ett test för östrogenicitet anses vara positivt om det finns en statistiskt signifikant ökning i livmodervikt ($p < 0,05$), åtminstone vid den höga dosnivån jämfört med lösningsmedelskontrollgruppen. Ett positivt resultat stöds också av en demonstration av ett biologiskt rimligt förhållande mellan dosen och responsens omfattning, med tanke på att överlappning av östrogena och antiöstrogena aktiviteter hos testkemikalien kan påverka dosresponskurvans form.

55. Man måste vara försiktig med att inte överskrida den maximalt tolererbara dosen för en meningsfull tolkning av data. Minskning av kroppsvikt, kliniska tecken och andra fynd bör noggrant utvärderas i detta hänseende.

56. En viktig fråga för godkännandet av data från den uterotrofa bioassayen är livmodervikterna i vehikelkontrollgruppen. Höga kontrollvärden kan äventyra responsen hos bioassayen och förmågan att upptäcka mycket svaga östrogenagonister. Litteraturstudier och data som genereras under valideringen av den uterotrofa bioassayen tyder på att höga kontrollmedelvärden kan förekomma spontant, i synnerhet hos omogna djur (se hänvisning 2, 3, 6, 9). Eftersom livmodervikten hos omogna råttor beror på många variabler som stam eller kroppsvikt, kan ingen definitiv övre gräns för livmodervikten ges. Som en vägledning bör, om de torra livmodervikterna hos omogna kontrollråttor ligger mellan 40 och 45 mg, kan resultatet betraktas som misstänkt, och livmodervikter över 45 mg kan leda till att testet görs om igen. Dock måste detta beaktas från fall till fall (se hänvisning 3, 6, 8). Vid testning på vuxna råttor kan ofullständig ovariektomi som kvarlämnar äggstocksvävnad producera endogent östrogen och fördröja regressionen av livmoderns vikt.

▼M5

57. Torra livmodervikter i vehikelkontroll som är mindre än 0,09 % av kroppsvikten för omogna honråttor, och mindre än 0,04 % för ovariektomerade unga vuxna honor tycks ge acceptabla resultat (se tabell 31 [hänvisning 2]). Om kontrollivmodervikterna är högre än dessa siffror, bör olika faktorer granskas, bland annat djurens ålder, korrekt ovariektomi, fytoöstrogener i foder, och så vidare, och ett negativt testresultat (ingen indikation på östrogen aktivitet) bör användas med försiktighet.

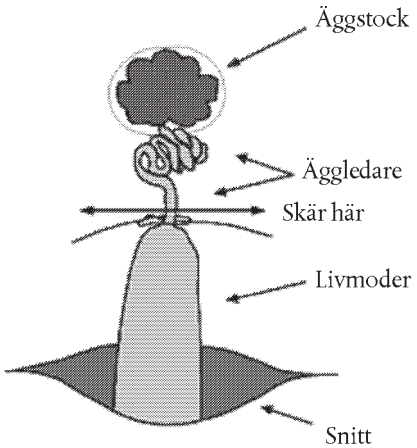
58. Historiska data för vehikelkontrollgrupperna bör bevaras i laboratoriet. Historiska data för responser på positiva referensöstrogener, såsom 17a-etinylestradiol, bör också bevaras i laboratoriet. Laboratorier kan också testa responsen på kända svaga östrogenagonister. Alla dessa data kan jämföras med tillgängliga data (se hänvisning 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8) för att säkerställa att laboratoriets metoder ger tillräcklig känslighet.

59. De torra livmodervikterna visade mindre variabilitet i samband med OECD:s valideringsstudie än de våta livmodervikterna (se hänvisning 6, 7). Däremot skulle en betydande respons i båda mätningarna tyda på att testkemikalien är positiv för östrogen aktivitet.

60. Den uterotrofa responsen är inte helt av östrogen ursprung, dock bör ett positivt resultat från den uterotrofa bioassayen generellt tolkas som bevis för östrogen potential *in vivo*, och bör normalt initiera åtgärder för vidare utredning (se punkt 9 och ”OECD:s ram för testning och bedömning av endokrinstörande kemikalier”, tillägg 2).

Figur 1

Schematiskt diagram som visar det kirurgiska avlägsnandet av äggstockarna



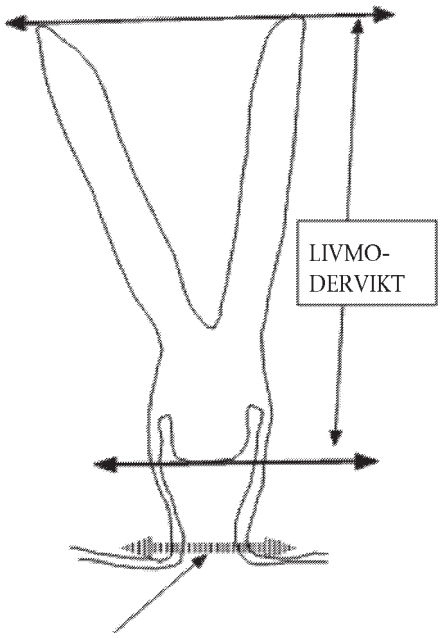
Mesometrium, blodkärl och fettkudde visas ej

Proceduren börjar med att den dorsolaterala bukväggen öppnas vid mittpunkten mellan revbensbroskets nedre kant och höftbenskammen, och några millimeter i sidled till den laterala kanten på ryggmuskeln. I bukhålan lokaliseras äggstockarna. På ett aseptiskt underlag avlägsnas sedan äggstockarna fysiskt från bukhålan, en ligatur placeras mellan äggstocken och livmodern för att hindra blödning, och äggstocken lossas genom ett snitt ovanför ligaturen vid förbindelsen mellan äggledaren och varje livmoderhorn. Efter att det bekräftats att ingen signifikant blödning kvarstår bör bukväggen tillslutas med suturer och huden tillslutas, t.ex. med autoclips eller sutur. Djuren bör få återhämta sig och livmoderns vikt får gå i regress i minst 14 dagar före användning.

▼M5

Figur 2

Borttagning och beredning av livmoderns vävnader för viktmätning



Proceduren börjar med att bukväggen öppnas vid blygdbenssammanfogningen. Sedan avlägsnas äggstockar, om de finns kvar, och livmoderhorn från den dorsala bukväggen. Urinblåsan och urinledarna avlägsnas från den ventrala och laterala sidan av livmodern och vaginan. Fibrös vidhäftning mellan rektum och vaginan tas bort tills sammanfogningen av vaginalöppningen och perineal hud kan identifieras. Livmodern och vaginan avskiljs från kroppen genom ett snitt i vaginalväggen precis ovanför förbindelsen mellan perineal hud, såsom visas i figuren. Livmodern avskiljs från kroppsväggen genom att livmoderbandet försiktigt skärs av vid fästpunkten, längs hela längden av den dorsolaterala aspekten av varje livmoderhorn. Efter uttagning ur kroppen putsas överflödigt fett och bindväv bort. Om äggstockarna finns kvar så tas äggstockarna bort från äggledarna varvid förlust av luminal vätska från livmoderhornet undviks. Om djuret har ovariektomerats bör resterna undersökas avseende förekomst av eventuell äggstocksvävnad. Vaginan tas bort från livmodern precis under livmoderhalsen så att livmoderhalsen är kvar i livmodern, såsom visas i figuren. Livmodern kan sedan vägas.

▼M5

Tillägg 1

DEFINITIONER

Antiöstrogenicitet: förmågan hos en kemikalie att undertrycka verkan av östradiol 17ß i en däggdjursorganism.

Kemikalie: ett ämne eller en blandning.

Födelsedatum: postnatal dag 0.

Dosering: en allmän term som omfattar dos, dess frekvens och doseringens varaktighet.

Dos: mängden testkemikalie som administreras. För uterotrof bioassay uttrycks dosen som vikten testkemikalie per enhet kroppsvikt hos försöksdjuret per dag (t.ex. mg/kg kroppsvikt/dag).

Maximal tolererbar dos (MTD): den största mängden av en kemikalie som, när den förs in i kroppen, inte dödar försöksdjuret (betecknas med LD_0) (IUPAC, 1993).

Östrogenicitet: förmågan hos en kemikalie att agera som östradiol 17ß i en däggdjursorganism.

Postnatal dag X: den X:e dagen i livet efter födelsedatum.

Känslighet: den andel av alla positiva/aktiva kemikalier som korrekt klassificeras genom testet. Detta är ett mått på noggrannhet för en testmetod som ger kategoriska resultat och är en viktig faktor vid bedömningen av en testmetods relevans.

Specificitet: den andel av alla negativa/inaktiva kemikalier som korrekt klassificeras genom testet. Detta är ett mått på noggrannhet för en testmetod som ger kategoriska resultat och är en viktig faktor vid bedömningen av en testmetods relevans.

Testkemikalie: varje ämne eller blandning som testas med denna testmetod.

Uterotrof: en term som används för att beskriva en positiv inverkan på tillväxten av livmodervävnad.

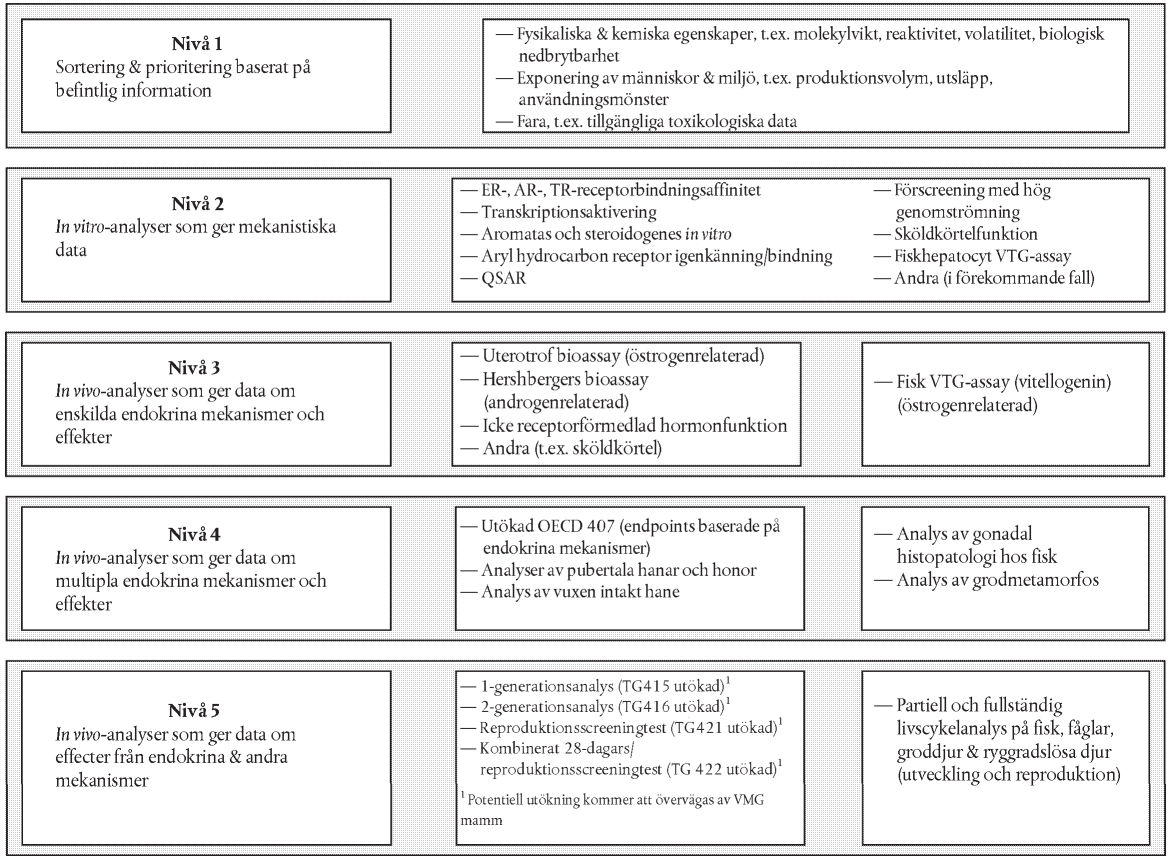
Validering: en vetenskaplig process utformad för att karakterisera de operativa kraven och begränsningarna hos en testmetod och visa dess tillförlitlighet och relevans för ett visst ändamål.

▼M5

Tillägg 2

Notera: Dokument utarbetat av testriktlinjeprogrammets sekretariat baserat på den överenskommelse som nåddes vid EDTA-arbetsgruppens 6:e möte

OECD:s konceptuella ram för testing och bedömning av endokrinstörande kemikalier



VMG mamm: Validation Management Group on Mammalian Testing and Assessment.

02008R0440 — SV — 18.05.2017 — 007.001 — 866

▼**M5**

NOTER TILL RAMEN:

Not 1: Inmatning på alla nivåer och utmatning på alla nivåer är möjlig och beror på vilken typ av befintliga informationsbehov för fara och riskbedömningsändamål.

Not 2: På nivå 5 bör ekotoxikologi omfatta endpoints som anger mekanismer för biverkningar och potentiella populationsskador.

Not 3: När en multimodal modell täcker flera av de enskilda endpointtesterna, ersätter denna modell användningen av de enskilda endpointtesterna.

Not 4: Bedömningen av varje kemikalie bör baseras på en bedömning från fall till fall, med beaktande av all tillgänglig information, med hänsyn till funktionen hos de övergripande nivåerna.

Not 5: Ramen bör inte betraktas som heltäckande för närvarande. På nivå 3, 4 och 5 finns det tester som antingen är tillgängliga, eller för vilka ett godkännande pågår. När det gäller den senare, ingår dessa preliminärt. När de väl har utvecklats och validerats, kommer de formellt att läggas till ramen.

Not 6: Nivå 5 bör inte betraktas som att den endast omfattar slutgiltiga tester. Tester som ingår på den nivån anses bidra till allmän faro- och riskbedömning.

▼M5

HÄNVISNINGAR

1. OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10–11 mars 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 ovarian 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. och 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. och 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. och 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. och 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 och 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. Europaparlamentets och rådets direktiv 2010/63/EU av den 22 september 2010 om skydd av djur som används för vetenskapliga ändamål (EUT L 276, 20.10.2010, s. 33).

▼M5

B.55 HERSHBERGERS BIOASSAY PÅ RÅTTA: ETT KORTTIDS-SCREENINGTEST FÖR (ANTI)ANDROGENA EGENSKAPER

INLEDNING

1. Denna testmetod motsvarar OECD:s testriktlinje (TG) 441 (2009). OECD inledde en högprioriterad verksamhet under 1998 för att se över befintliga riktlinjer och ta fram nya riktlinjer för screening och testning av potentiellt hormonstörande ämnen (se hänvisning 1). En del av verksamheten var att ta fram en riktlinje för Hershbergers bioassay på råtta. Efter att ha i flera decennier ha använts av läkemedelsindustrin, standardiserades detta test först av en officiell expertkommitté 1962 som ett screeningverktyg för androgena kemikalier (se hänvisning 2). Under 2001–2007 har Hershbergers bioassay på råtta genomgått ett omfattande valideringsprogram med framtagningen av ett bakgrundsgranskningsdokument (se hänvisning 23), sammanställningen av ett detaljerat metoddokument (se hänvisning 3), utvecklingen av en dissektionsvägledning (se hänvisning 21) och genomförandet av omfattande studier inom och mellan laboratorier för att visa tillförlitligheten och reproducerbarheten hos bioassayen. Dessa valideringsstudier har genomförts med en potent referensandrogen (testosteronpropionat [TP]), två potenta syntetiska androgener (trenbolonacetat och metyltestosteron), ett potent antiandrogent läkemedel (flutamid), en potent hämmare av syntesen (finasterid) hos det naturliga androgenet (dihydrotestosteron-DHT), flera svagt antiandrogena bekämpningsmedel (linuron, vinklozolin, procymidon, p,p'-DDE), en potent 5α reduktashämmare (finasterid) och två kända negativa kemikalier (dinitrofenol och nonylfenol) (se hänvisning 4, 5, 6, 7, 8). Denna testmetod är resultatet av lång historisk erfarenhet av bioassayen och de erfarenheter som vunnits under valideringstestprogrammet, samt de resultat som erhållits därifrån.

2. Hershbergers bioassay är ett *in vivo*-korttidsscreeningtest som använder tillhörande vävnader från hanliga könsorgan. Testet har sitt ursprung på 1930-talet och ändrades på 1940-talet till att omfatta androgenmottagliga muskler i hanliga könsorgan (se hänvisning 2, 9–15). På 1960-talet utvärderades över 700 möjliga androgener med hjälp av en standardiserad version av protokollet (se hänvisning 2, 14) och användningen av testet för både androgener och antiandrogener ansågs vara en standardmetod på 1960-talet (se hänvisning 2, 15). Den nuvarande bioassayen bygger på förändringar i vikten för fem androgenberoende vävnader hos den kastratperipubertala hanråttan. Den utvärderar förmågan hos en kemikalie att framkalla biologiska aktiviteter som är förenliga med androgena agonister, antagonister eller 5α-reduktashämmare. De fem androgenberoende målvävnaderna som ingår i denna testmetod är den ventrala prostatan (VP), sädesblåsor (SV) (plus vätskor och koagulerande körtlar), levator ani-bulbocavernosusmuskler (LABC), pariga Cowpers körtlar (COW) och ollonet (GP). Hos den kastratperipubertala hanråttan svarar dessa fem vävnader på androgener med en ökning i absolut vikt. När dessa samma vävnader stimuleras för att öka i vikt genom administrering av en potent referensandrogen svarar dessa fem vävnader på antiandrogener med en minskning av absolut vikt. Den primära modellen för Hershbergers bioassay har varit den kirurgiskt kastrerade peripubertala hanen, som validerades i fas 1, 2 och 3 i Hershbergers valideringsprogram.

3. Hershbergers bioassay fungerar som ett mekanistiskt *in vivo*-screeningtest för androgena agonister, androgenantagonister och 5a-reduktashämmare och dess tillämpning bör ses mot bakgrund av ”OECD:s konceptuella ram för testning och bedömning av endokrinstörande kemikalier” (tillägg 2). I denna

▼M5

konceptuella ram ingår den uterotrofa bioassayen i nivå 3 som ett *in vivo*-test som ger data om en enda endokrin mekanism, dvs. östrogenicitet. Den är avsedd att ingå i en serie *in vitro*- och *in vivo*-tester för att identifiera kemikalier med potential att interagera med det endokrina systemet, vilket slutligen leder till faro- och riskbedömningar av människors hälsa eller miljön.

4. På grund av djurskyddsaspekter vad gäller kastrering undersöktes om den intakta (okastrerade) stimulerade avvanda hanen kunde vara en alternativ modell för Hershbergers bioassay för att undvika kastreringssteget. Testmetoden med stimulerade avvanda hanar validerades (se hänvisning 24), men i valideringsstudierna verkade inte denna version av Hershbergers bioassay konsekvent kunna upptäcka effekter på androgenberoende organvikter från svaga antiandrogener vid de testade doserna. Därför har versionen med avvanda hanar inte inkluderats i den här testmetoden. Eftersom dess användning inte bara ger djurskyddsfördelar utan också kan ge information om andra verkningssätt finns den dock beskriven i OECD:s vägledning 115 (se hänvisning 25).

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN OCH BEGRÄNSNINGAR

5. Androgena agonister och antagonister fungerar som ligander för androgenreceptorn och kan aktivera eller hämma respektive gentranskription som styrs av receptorn. Dessutom kan vissa kemikalier inhibera omvandlingen av testosteron till den mer potenta naturliga androgenen dihydrotestosteron i vissa androgena målvävnader (5a-reduktashämmare). Sådana kemikalier har potentialen att leda till negativa hälsorisker, inklusive reproduktions- och utvecklingseffekter. Därför finns regleringsbehovet av att snabbt bedöma och utvärdera en kemikalie som en möjlig androgen agonist eller antagonist, eller 5a-reduktashämmare. Även om den är informativ så är affiniteten hos en ligand för en androgen receptor mätt genom receptorbindning eller transkriptionsaktivering av reportergener *in vitro* inte den enda faktorn för möjlig fara. Andra avgörande faktorer inkluderar metabolisk aktivering och avaktivering vid införandet i kroppen, kemisk distribution till målvävnader samt eliminering ur kroppen. Detta leder till behovet att screena den möjliga aktiviteten hos kemikalien *in vivo* under relevanta förhållanden och exponeringar. *In vivo*-utvärdering är mindre kritisk om kemikaliens egenskaper vad gäller absorption, distribution, metabolism och eliminering (Adme) är kända. Androgenberoende vävnader svarar med en snabb och kraftig tillväxt vid stimulering med androgener, framför allt i kastratperipubertala hanråttor. Gnagare, framför allt råtta, är också vanliga i toxicitetsstudier för riskbedömning. Därför är den version av testet som använder den kastrerade peripubertala råttan och de fem målvävnaderna i detta test lämplig för *in vivo*-screening av androgena agonister och antagonister samt 5a-reduktashämmare.

6. Denna testmetod baseras på de protokoll som användes i OECD:s valideringsstudie vilken har visat sig vara tillförlitlig och repeterbar i studier inom och mellan laboratorier (se hänvisning 4, 5, 6, 7, 8). Både androgen- och antiandrogenförfaranden presenteras i denna testmetod.

7. Även om det fanns en viss variation i den dos TP som användes för att upptäcka antiandrogener i OECD:s valideringsprogram för Hershbergers bioassay i olika laboratorier (0,2 jämfört med 0,4 mg/kg/d, subkutan injektion) fanns det liten skillnad mellan dessa två protokollvariationer i förmågan att detektera svag eller stark antiandrogen aktivitet. Det är emellertid klart att dosen av TP inte bör vara alltför hög för att blockera effekterna av svaga androgenreceptor (AR)-antagonister eller så låg att de androgena vävnaderna visar liten tillväxtrespons även utan antiandrogen samadministration.

▼M5

8. Tillväxtresponsen för de individuella androgenberoende vävnaderna är inte helt och hållet av androgent ursprung, dvs. andra kemikalier än androgena agonister kan förändra vikten hos vissa vävnader. Dock bestyrker tillväxtresponsen för flera vävnader samtidigt en mer androgenspecifik mekanism. Exempelvis kan höga doser av potenta östrogener öka sädesblåsornas vikt, dock reagerar de andra androgenberoende vävnaderna i testet inte på ett liknande sätt. Antiandrogena kemikalier kan antingen fungera som androgenreceptorantagonister eller som 5a-reduktashämmare. 5a-reduktashämmare har en varierbar effekt, eftersom omvandlingen till mer potent dihydrotestosteron varierar beroende på vävnad. Antiandrogener som hämmar 5α-reduktas, såsom finasterid, har mer uttalade effekter i den ventrala prostatan än i övriga vävnader jämfört med en potent AR-antagonist, såsom flutamid. Denna skillnad i vävnadsrespons kan användas för att skilja mellan AR-medierade och 5α-reduktasmedierade verkningsmekanismer. Dessutom är androgenreceptorn evolutionärt besläktad med den hos andra steroidhormoner, och vissa andra hormoner, när de ges i höga suprafysiologiska doseringsnivåer, kan binda och motverka de tillväxtfrämjande effekterna av TP (se hänvisning 13). Vidare är det också troligt att ökad steroidmetabolism och en åtföljande sänkning av serumtestosteron kan minska androgenberoende vävnadstillväxt. Därför bör varje positivt resultat i Hershbergers bioassay normalt utvärderas med hjälp av en sammanvägd bedömning, inklusive *in vitro*-tester, såsom AR- och östrogenreceptor (ER)-bindningstester och motsvarande transkriptionsaktiveringstester, eller från andra *in vivo*-tester som undersöker liknande androgena målvävnader, såsom pubertal hanetest, 15-dagarstest av vuxen intakt hane, eller 28-dagars- eller 90-dagarsstudie med upprepad dosering.

9. Erfarenheten visar att xenobiotiska androgener är mer ovanliga än xenobiotiska antiandrogener. Förhoppningen är att Hershbergers bioassay kan användas oftare för screeningen av antiandrogener. Förfarandet att testa för androgener kan ändå rekommenderas för steroida eller steroidliknande kemikalier, eller kemikalier för vilka en indikation på eventuella androgena effekter härrör från metoder som ingår i nivå 1 eller 2 i den konceptuella ramen (tillägg 2). På samma sätt kan negativa effekter i samband med (anti-)androgena profiler observeras i nivå 5-tester, vilket leder till behovet att bedöma om en kemikalie styrs av en endokrin verkningsmekanism.

10. Alla djurbaserade förfaranden bör uppfylla lokala normer för djurvård. De beskrivningar av vård och behandling som anges nedan är minimala prestandakrav som kommer att ersättas av lokala föreskrifter som t.ex. Europaparlamentets och rådets direktiv 2010/63/EU av den 22 september 2010 om skydd av djur som används för vetenskapliga ändamål (se hänvisning 26). Ytterligare vägledning om human behandling av djur finns i OECD (se hänvisning 17).

11. Som i alla bioassayer som använder sig av försöksdjur, bör noggranna överväganden göras om nödvändigheten av att genomföra denna studie. I princip kan det finnas två skäl till ett sådant beslut:

— Hög exponeringspotential (nivå 1 i den konceptuella ramen) eller indikationer på (anti-)androgenicitet i *in vitro*-tester (nivå 2) som stöder undersökningar huruvida sådana effekter kan uppstå *in vivo*.

— Effekter som överensstämmer med (anti-)androgenicitet på nivå 4 eller 5 i *in vivo-test* för undersökningar av särskilda verkningsmekanismer, t.ex. för att avgöra om effekterna berodde på en (anti-)androgen mekanism.

▼M5

12. Definitioner som används i denna testmetod finns i tillägg 1.

PRINCIP FÖR TESTMETODEN

13. Hershbergers bioassay uppnår sin känslighet genom att använda hanar med minimal endogen androgenproduktion. Detta uppnås genom användning av kastrerade hanar som ges tillräcklig tid efter kastreringen för att låta målvävnaderna gå i regress till en minimal och jämn utgångsvikt. Vid screeningen av potentiell androgen aktivitet, när det finns låga endogena nivåer av cirkulerande androgener och hypotalamus-hypofys-gonad-axeln inte kan återges för att kompensera via återkopplingsmekanismer, så maximeras vävnadernas respons och vävnadernas utgångsviktsvariationer minimeras. Vid screening av potentiell antiandrogen aktivitet kan en mer enhetlig vävnadsviktökning uppnås när vävnaderna stimuleras av en referensandrogen. Som en följd kräver Hershbergers bioassay endast 6 djur per dosgrupp, medan andra tester med intakta pubertala eller vuxna hanar föreslår att man använder15 hanar per dosgrupp.

14. Kastrering av peripubertala hanråttor bör ske på lämpligt sätt med godkända bedövningsmedel och aseptisk teknik. Smärtstillande medel bör administreras de närmaste dagarna efter operationen för att eliminera postoperativa obehag. Kastrering förbättrar testets precision när det gäller att upptäcka svaga androgener och antiandrogener, genom att eliminera kompensatoriska endokrina återkopplingsmekanismer som finns hos intakta djur som kan dämpa effekterna av administrerade androgener och antiandrogener, och genom att eliminera de stora variationerna i serumtestosteronnivåer mellan individer. Följaktligen minskar kastreringen antalet djur som krävs för att screena för dessa endokrina aktiviteter.

15. Vid screening för potentiell androgen aktivitet, administreras testkemikalien dagligen genom oral sondmatning eller subkutan injektion under en period av tio dagar i följd. Testkemikalier administreras till minst två behandlingsgrupper av försöksdjur med en dosnivå per grupp. Djuren obduceras cirka 24 timmar efter sista dosen. En statistiskt signifikant ökning av vikter för två eller flera målorgan i testkemikaliegrupperna jämfört med vehikelkontrollgruppen, tyder på att testkemikalien är positiv för potentiell androgen aktivitet (se punkt 60). Androgener som trenbolon, som inte kan 5α-reduceras har mer uttalade effekter på LABC och GP kontra TP, men alla vävnader bör visa ökad tillväxt.

16. Vid screening av potentiell antiandrogen aktivitet, administreras testkemikalien dagligen via oral sondmatning eller subkutan injektion under en period av tio dagar i följd tillsammans med dagliga TP-doser (0,2 eller 0,4 mg/kg/d) genom subkutan injektion. Det fastställdes i valideringsprogrammet att endera 0,2 eller 0,4 mg/kg/d av TP kan användas eftersom båda är effektiva vid upptäckt av antiandrogener och därför bör man endast använda en dos i testet. Graderade testkemikaliedoser administreras till minst tre behandlingsgrupper av försöksdjur, med en dosnivå per grupp. Djuren obduceras cirka 24 timmar efter sista dosen. En statistiskt signifikant minskning av vikterna hos två eller flera målorgan i testkemikalie- plus TP-grupperna jämfört med endast TP-kontrollgruppen, tyder på att testkemikalien är positiv för potentiell antiandrogen aktivitet (se punkt 61).

▼M5

BESKRIVNING AV METODEN

Val av art och stam

17. Råttan har rutinmässigt använts i Hershbergers bioassay sedan 1930-talet. Det är biologiskt sannolikt att både råtta och mus visar liknande responser, men baserat på 70 års erfarenhet av råttmodellen är råttan den art som väljs för Hershbergers bioassay. Dessutom, eftersom data från Hershbergers bioassay kan användas som förberedelse för en långtids flergenerationsstudie, möjliggör detta att djur från samma art, stam och ursprung används för båda studierna.

18. Detta protokoll möjliggör för laboratorier att välja den stam av råtta som ska användas i testet, vilket i regel bör vara den som historiskt sett använts av det deltagande laboratoriet. Vanligen använda laboratorieråttstammar kan användas, men stammar som mognar betydligt senare än 42 dagar bör inte användas, eftersom kastrering av dessa hanar vid 42 dagars ålder kan hindra mätningar av ollonvikter, vilket endast kan göras efter det att förhuden separerats från penisskaftet. Därför bör stammar som härrör från Fisher 344-råttan inte användas, utom i sällsynta fall. Fisher 344-råttan utvecklas sexuellt vid en annan tidpunkt jämfört med andra oftare använda stammar såsom Sprague Dawley- eller Wistar-stammar (se hänvisning 16). Om en sådan stam ska användas bör laboratoriet kastrera dem vid en något högre ålder och kunna påvisa känsligheten hos den stam som används. Laboratoriet bör tydligt ange motiveringen för valet av råttstam. När screeningtestet är inledningen till en upprepad oralstudie, en reproduktions- och utvecklingsstudie eller en långtidsstudie ska helst djur från samma stam och ursprung användas till alla studierna.

Inhysnings- och utfodringsförhållanden

19. Alla förfaranden bör överensstämma med samtliga lokala normer för laboratoriedjurvård. Dessa beskrivningar av vård och behandling är minimikrav och kommer att ersättas av mer stringenta lokala föreskrifter som t.ex. Europaparlamentets och rådets direktiv 2010/63/EU av den 22 september 2010 om skydd av djur som används för vetenskapliga ändamål (se hänvisning 26). Temperaturen i djurutrymmet bör vara 22 °C (med ett ungefärligt intervall på ± 3 °C). Den relativa fuktigheten bör vara minst 30 % och bör helst inte överstiga 70 %, utom när rummet rengörs. Målet bör vara relativ luftfuktighet på 50–60 %. Artificiell belysning bör användas. Den dagliga belysningssekvensen bör vara 12 timmar ljus, 12 timmar mörker.

20. Gruppinhysning är att föredra framför isolering, på grund av djurens låga ålder och det faktum att råttor är sociala djur. Genom inhysning av två eller tre djur per bur undviks trängsel och åtföljande stress som kan störa den hormonella kontrollen av utvecklingen av de tillhörande könsvävnaderna. Burarna bör rengöras noggrant för att avlägsna eventuella föroreningar, och placeras på ett sådant sätt att eventuell påverkan på grund av placeringen minimeras. Burar av lämplig storlek (~ 2 000 kvadratcentimeter) förhindrar överbeläggning.

21. Varje djur ska identifieras individuellt (t.ex. öronmärkning eller etikett) med en human metod. Identifieringsmetoden bör registreras.

▼M5

22. Djuren ska ha fri tillgång till laboratoriefoder och dricksvatten. Laboratorier som utför Hershbergers bioassay bör använda det laboratoriefoder som normalt används i deras kemikalietestningsarbete. I valideringsstudierna för bioassayen observerades inga effekter eller variationer som kan hänföras till fodret. Det foder som används registreras, och ett prov av laboratoriefodret bör behållas för framtida analys.

Prestandakriterier för androgenberoende organvikter

23. Under valideringsstudien fanns inga bevis för att en minskning av kroppsvikten påverkade ökningar eller minskningar av tillväxten av vävnadsvikter hos målvävnaderna (dvs. detta bör vägas in i denna studie).

24. Bland de olika råttstammar som framgångsrikt använts i valideringsprogrammet, är de androgenberoende organvikterna större hos de tyngre råttstammarna än hos de lättare stammarna. Därför inkluderar inte prestandakriterierna för Hershbergers bioassay absoluta förväntade organvikter för positiva och negativa kontroller.

25. Eftersom variationskoefficienten för en vävnad har ett omvänt förhållande till statistisk styrka, är prestationskriterierna för Hershbergers bioassay baserat på maximala CV-värden för varje vävnad (tabell 1). Variationskoefficienterna härrör från OECD:s valideringsstudier. Vid negativa resultat bör laboratorierna granska variationskoefficienterna från kontrollgruppen och högdosbehandlingsgruppen för att avgöra om de maximala prestandakriterierna för variationskoefficienten har överskridits.

26. Studien bör upprepas om 1) tre eller fler av tio möjliga individuella variationskoefficienter i kontroll- och högdosbehandlingsgrupperna överstiger det maximum som utsetts för agonist- och antagoniststudier i tabell 1 och 2) minst två målvävnader var marginellt obetydliga, dvs. r-värden mellan 0,05 och 0,10.

Tabell 1

Högsta tillåtna variationskoefficienter som fastställts för målkönets tillhörande vävnader i kastratmodellen i OECD:s valideringsstudier ([1])**.**

Vävnad	Antiandrogena effekter	Androgena effekter
Sädesblåsor	40 %	40 %
Ventral prostata	40 %	45 %
LABC	20 %	30 %
Cowpers körtlar	35 %	55 %
Ollon	17 %	22 %

([1]) Variationskoefficientens tröskelvärde för en given vävnad identifierades från en kurva över variationskoefficientvärden – ordnade från minsta sekventiella till största – för alla medelvärden från alla experiment under valideringsperioden med användning av en specifik modell (agonist eller antagonist). Variationskoefficientens tröskelvärde avlästes från den punkt vid vilken stegen mellan de näst högsta variationskoefficienterna i serien är dramatiskt större än de få föregående variationskoefficienterna – ”brytpunkten”. Det bör noteras att även om denna analys identifierade relativt pålitliga ”brytpunkter” för antagonistmodellen av testet, visade variationskoefficientkurvorna i agonisttestet en mer likformig ökning vilket gör identifieringen av ett tröskelvärde för variationskoefficienten med denna metod något godtycklig.

▼M5

FÖRFARANDE

Regelefterlevnad och laboratoriekontroll

27. Till skillnad från den uterotrofa assayen (kapitel B.54 i denna bilaga) är en demonstration av laboratoriets kompetens innan studien påbörjas inte nödvändig för Hershbergers bioassay eftersom jämsides behandlade positiva (testosteronpropionat och flutamid) och negativa kontroller körs som en integrerad del av testet.

Djurens antal och tillstånd

28. Varje behandlad grupp och kontrollgrupp bör bestå av minst 6 djur. Detta gäller både det androgena och det antiandrogena protokollet.

Kastrering

29. Efter mottagandet av djuren bör de få en inledande acklimatiseringsperiod på flera dagar så att man ser att de är friska och trivs. Eftersom djur som kastreras före 42 dagars ålder eller postnatal dag (PND) 42 kanske inte uppvisar preputial separation, så bör djuren kastreras på PND 42 eller senare, inte tidigare. Djuren kastreras under bedövning genom att ett snitt görs i pungen, och både testiklarna och bitestiklarna avlägsnas med underbindning av blodkärl och sädesledare. Efter att det bekräftats att ingen blödning uppstått bör pungen tillslutas med sutur eller autoclips. Djuren bör behandlas med smärtstillande medel under de närmaste dagarna efter operationen för att lindra eventuella postoperativa obehag. Om kastrerade djur köps från en djurleverantör så bör djurens ålder och könsmognad garanteras av leverantören.

Acklimatisering efter kastreringen

30. Djuren bör fortsätta sin acklimatisering till laboratoriemiljön för att låta målvävnadsvikterna gå i regress under minst sju dagar efter kastreringen. Djuren bör observeras dagligen, och alla djur som visar tecken på sjukdom eller fysiska avvikelser bör tas bort. Således kan behandling med dosering (studie) påbörjas så tidigt som PND 49, dock inte senare än PND 60. Ålder vid obduktionen bör inte vara högre än PND 70. Denna flexibilitet gör det möjligt för ett laboratorium att effektivt schemalägga det experimentella arbetet.

Kroppsvikt och grupprandomisering

31. Skillnader i individuella kroppsvikter är en källa till variabilitet i vävnadsvikterna både inom och mellan grupper av djur. Ökande vävnadsviktsvariabilitet resulterar i en ökad variationskoefficient (CV) och minskar den statistiska styrkan i testet (ibland kallad testkänslighet). Därför bör variationer i kroppsvikt kontrolleras både experimentellt och statistiskt.

32. Experimentell kontroll innebär små variationer i kroppsvikt inom och mellan studiegrupperna. För det första bör ovanligt små eller stora djur undvikas och inte placeras ut i studiekohorten. Vid studieinledningen bör viktskillnaden mellan djuren som används inte överstiga ± 20 % av medelvikten (t.ex. 175 g ± 35 g för kastrerade peripubertala råttor). För det andra bör djuren anvisas till grupper (både kontroll- och behandlingsgrupper) genom slumpmässig viktfördelning, så att medelvärdet för kroppsvikten i varje grupp inte statistiskt skiljer sig från andra grupper. Det förfarande som används för blockrandomisering bör registreras.

▼M5

33. Eftersom toxicitet kan minska kroppsvikten hos de behandlade grupperna jämfört med kontrollgruppen kan kroppsvikten på den första dagen för testkemikalieadministration användas som den statistiska kovariaten, och inte kroppsvikten vid obduktion.

Dosering

34. För att fastställa huruvida en testkemikalie kan ha androgen verkan *in vivo*, räcker det oftast med två dosgrupper av testkemikalien plus positiv kontroll och vehikelkontroll (negativ) (se punkt 43). Denna utformning är därför att föredra av djurskyddsskäl. Om syftet är att antingen erhålla en dos-responskurva eller att extrapolera till lägre doser, behövs minst 3 dosgrupper. Om information utöver identifiering av androgen aktivitet (t.ex. en uppskattning av potens) krävs, bör ett annat doseringsschema övervägas. För att testa för antiandrogener ges testkemikalien tillsammans med en referensandrogenagonist. Minst 3 testgrupper bör användas med olika doser av testkemikalien, samt en positiv och en negativ kontroll (se punkt 44). Med undantag av behandlingen med testkemikalien bör djuren i kontrollgruppen hanteras på exakt samma sätt som testgruppen. Om en vehikel används för att tillföra testkemikalien bör kontrollgruppen tillföras vehikeln i den största volym som används för testgruppen.

35. Alla dosnivåer bör väljas med hänsyn till eventuella toxicitetsdata och (toxiko-)kinetiska data som finns tillgängliga om testkemikalien eller närbesläktade ämnen. Den högsta dosnivån bör först ta hänsyn till LD_{50} och/eller information som akut giftighet för att undvika dödsfall, svår smärta och lidande hos djuren (se hänvisning 17, 18, 19, 20), och för det andra ta hänsyn till tillgänglig information om de doser som använts i subkroniska och kroniska studier. I allmänhet bör högsta den dosen inte orsaka en minskning av den slutliga kroppsvikten hos djuren som är större än 10 % av kontrollvikten. Den högsta dosen bör antingen vara 1) den högsta dos som garanterar djurens överlevnad utan signifikant toxicitet eller lidande för djuren efter tio dagar i följd med administrering upp till en maximal dos på 1 000 mg/kg/dag (se punkt 36) eller 2) en dosinducerande (anti-)androgen effekt, beroende på vilken som är lägre. Vid en screening är stora mellanrum, t.ex. en halv log-enhet (motsvarande en dosprogression av 3,2) eller till och med en log-enhet mellan doseringarna acceptabla. Om det inte finns några lämpliga data tillgängliga, kan en dosfinnande studie (se punkt 37) genomföras som hjälp för att bestämma vilka doser som ska användas.

Dosnivågräns

36. Om ett test vid dosgränsen 1 000 mg/kg kroppsvikt/dag och en lägre dos, med hjälp av de förfaranden som beskrivs för denna studie, inte leder till en statistiskt signifikant förändring av reproduktionsorganens vikter, anses ytterligare dosnivåer vara onödiga. Dosgränsen tillämpas utom när human exponering anger att en högre dosnivå ska användas.

Överväganden för dosfinnande studie

37. Vid behov kan en preliminär dosfinnande studie genomföras med några få djur för val av lämpliga dosgrupper (med hjälp av metoder för testning av akut toxicitet [kapitel B.1a, B.1b i denna bilaga (se hänvisning 27), OECD TG 425 (se hänvisning 19)]). Målet för Hershbergers bioassay är att välja doser som garanterar djurens överlevnad och som inte innebär signifikant toxicitet eller lidande för djuren efter tio dagar i följd med administrering av

▼M5

kemikalien upp till en gränsdos på 1 000 mg/kg/dag som angetts i punkterna 35 och 36. För detta ändamål kan man använda OECD:s vägledning (se hänvisning 17) som definierar kliniska tecken som tyder på toxicitet eller lidande för djuren. Om det är möjligt inom denna dosfinnande studie kan, efter tio dagars tillförsel, målorganen skäras ut och vägas ca 24 timmar efter att sista dosen getts. Dessa data kan sedan användas som hjälp vid valet av doser i huvudstudien.

Referenskemikalier och vehikel

38. Referensandrogenagonist bör vara testosteronpropionat (TP), CAS-nr 57-82-5. TP-referensdosen kan antingen vara 0,2 mg/kg kroppsvikt/d eller 0,4 mg/kg kroppsvikt/d. Referensandrogenantagonist bör vara flutamid (FT), CAS-nr 1311-84-7. FT-referensdosen bör vara 3 mg/kg kroppsvikt/d och bör ges tillsammans med TP-referensdosen.

39. Det rekommenderas att i första hand överväga att använda en vattenbaserad lösning/suspension, om det är möjligt. Men eftersom många androgenligander eller deras metaboliska prekursorer tenderar att vara hydrofoba, är den vanligaste metoden att använda en lösning/suspension i olja (t.ex. majs-, jordnöts-, sesam- eller olivolja). Testkemikalier kan lösas upp i en minimal mängd av 95 % etanol eller annat lämpligt lösningsmedel och spädas ut till slutliga koncentrationer i testvehikeln. De toxiska egenskaperna hos lösningsmedlet bör vara kända, och bör testas med endast lösningsmedel i en separat kontrollgrupp. Om testkemikalien bedöms vara stabil, kan försiktig uppvärmning och kraftig mekanisk påverkan användas för att hjälpa till att lösa upp testkemikalien. Testkemikaliens stabilitet i vehikeln bör bestämmas. Om testkemikalien är stabil under hela studien, så kan en startalikvot av testkemikalien beredas, och de angivna doseringsutspädningarna noggrant beredas dagligen för att undvika kontaminering och nedbrytning av proverna.

Tillförsel av doser

40. TP ska tillföras genom subkutan injektion och FT genom oral sondmatning.

41. Testkemikalien tillförs via sondmatning eller subkutan injektion. Djurskyddsaspekter och testkemikalien fysikalisk-kemiska egenskaper måste beaktas vid val av administreringsväg. Dessutom måste toxikologiska aspekter, som relevans till mänsklig exponeringsväg av kemikalien (t.ex. oral sondmatning till modellförtäring, subkutan injektion till inandningsmodell eller dermal adsorption) och befintlig toxikologisk information och data om metabolism och kinetik (t.ex. behovet av att undvika första passage-metabolism, bättre effektivitet via en bestämd väg) beaktas innan omfattande, långvariga tester påbörjas om positiva resultat erhålls genom injektion.

42. Djuren bör doseras på samma sätt och tidssekvens under tio dagar i följd med ca 24 timmars mellanrum. Doseringsnivån bör justeras dagligen på basis av samtidiga dagliga mätningar av kroppsvikt. Dosvolymen och tidpunkten då den tillförs bör registreras varje exponeringsdag. Försiktighet bör iakttas så att inte den maximala dosen överskrids såsom beskrivs i punkt 35 för att möjliggöra en meningsfull tolkning av data. Minskning av kroppsvikt, kliniska tecken och andra fynd bör noggrant utvärderas i detta avseende. Vid oral sondmatning bör en magsond eller en lämplig

▼M5

intubationskanyl användas. Den största mängd vätska som kan administreras vid ett tillfälle beror på försöksdjurets storlek. Lokala djurvårdsriktlinjer bör följas, men volymen bör inte överstiga 5 ml/kg kroppsvikt, utom i fråga om vattenlösningar där 10 ml/kg kroppsvikt får användas. Vid subkutana injektioner bör doserna administreras till dorsoscapular- och/eller lumbarregionen via steril nål (t.ex. med grovleken 23 eller 25) och en tuberkulinspruta. Rakning av injektionsstället är valfritt. Eventuella förluster, läckage vid injektionsstället eller ofullständig dosering ska registreras. Den totala volymen injicerad per råtta per dag bör inte överstiga 0,5 ml/kg kroppsvikt.

Särskilda förfaranden för androgena agonister

43. För testet för androgena agonister är vehikeln den negativa kontrollen och den TP-behandlade gruppen den positiva kontrollen. Biologisk aktivitet i överensstämmelse med androgena agonister testas genom administration av en testkemikalie till behandlingsgrupper vid de valda doserna under 10 dagar i följd. Vikterna för de fem tillhörande könsvävnaderna från testkemikaliegrupperna jämförs med vehikelgruppen för statistiskt signifikanta ökningar av vikterna.

Särskilda förfaranden för androgena antagonister och 5α-reduktashämmare

44. Vid testet för androgena antagonister och 5α-reduktashämmare, är den TP-behandlade gruppen den negativa kontrollen, och gruppen som samtidigt tillförs TP- och FT-referensdoser den positiva kontrollen. Biologisk aktivitet i överensstämmelse med androgena antagonister och 5α-reduktashämmare testas genom tillförsel av en TP-referensdos samt tillförsel av testkemikalien under tio dagar i följd. Vikterna hos de fem tillhörande könsvävnaderna från TP samt testkemikaliegrupperna jämförs med TP-referensgruppen (endast TP) avseende statistiskt signifikanta minskningar av vikterna.

OBSERVATIONER

Kliniska observationer

45. Allmänna kliniska observationer bör göras minst en gång per dag och oftare när tecken på toxicitet observeras. Observationerna bör företrädesvis utföras vid samma tidpunkt varje dag och med hänsyn till förväntade toppeffekter efter doseringen. Alla djur bör observeras avseende dödlighet, sjuklighet och allmänna kliniska tecken såsom förändringar i beteende, hud, päls, ögon, slemhinnor, förekomst av sekret och utsöndringar samt autonom aktivitet (t.ex. tårflöde, piloerektion, pupillstorlek, ovanligt andningsmönster).

46. Alla djur som hittas döda ska avlägsnas och bortskaffas utan ytterligare dataanalys. All dödlighet hos djuren före obduktionen bör ingå i studieresultatet tillsammans med eventuella orsaker till dödligheten. Eventuella döende djur bör avlivas på ett humant sätt. Eventuella döende och sedan avlivade djur bör ingå i studieresultatet med uppenbara orsaker till sjukligheten.

▼M5

Kroppsvikt och foderkonsumtion

47. Alla djur bör vägas dagligen med en noggrannhet på 0,1 g, med början strax före starten av behandlingen, dvs. när djuren fördelas i grupper. Som en valfri mätning, kan mängden foder som konsumeras under behandlingsperioden mätas per bur genom vägning av fodertrågen. Foderkonsumtionsresultaten bör uttryckas i gram per råtta per dag.

Dissekering och mätning av vävnads- och organvikter

48. Cirka 24 timmar efter den sista administreringen av testkemikalien bör råttorna avlivas och tömmas på blod enligt de normala förfarandena på laboratoriet och obduktion utföras. Metoden för human avlivning bör registreras i laboratorierapporten.

49. Helst ska obduktionsordningen randomiseras mellan grupperna för att undvika progression direkt upp eller ner i dosgrupperna vilket kan påverka data. Alla fynd vid obduktionen, dvs. patologiska förändringar/synliga skador, bör noteras och rapporteras.

50. De fem androgenberoende vävnaderna (VP, SV, LABC, COW, GP) ska vägas. Dessa vävnader bör skäras ut, noggrant putsas från överflödig angränsande vävnad och fett, och deras färska (ofixerade) vikter bestämmas. Varje vävnad bör hanteras med särskild omsorg för att undvika förlust av vätska och undvika uttorkning, vilket kan medföra väsentliga fel och variabilitet genom att minska de registrerade vikterna. Flera av vävnaderna kan vara mycket små eller svåra att dissekera, och detta kommer att medföra variabilitet. Därför är det viktigt att personer som utför dissektion av tillhörande könsvävnader är bekanta med standarddissektionsförfaranden för dessa vävnader. En handbok med standardförfaranden för genomförande (*standard operation procedure*, SOP) av dissektion finns tillgänglig från OECD (se hänvisning 21). Noggrann utbildning enligt SOP-vägledningen minimerar en potentiell källa till variation i studien. Helst bör samma person ansvara för dissektion av en given vävnad för att eliminera skillnader i vävnadsbehandling mellan olika personer. Om detta inte är möjligt bör obduktionen utformas så att varje person dissekerar en viss vävnad från alla behandlingsgrupper, i stället för att en person dissekerar alla vävnader från en kontrollgrupp medan någon annan är ansvarig för de behandlade grupperna. Varje tillhörande könsvävnad bör vägas utan torkning med en noggrannhet på 0,1 mg, och vikten registreras för varje djur.

51. Flera av vävnaderna kan vara mycket små eller svåra att dissekera, och detta kommer att medföra variabilitet. Tidigare arbete har indikerat ett intervall för variationskoefficienter som förefaller skilja sig beroende på laboratoriets skicklighet. I några få fall har stora skillnader i de absoluta vikterna av vävnader såsom VP och COW observerats inom ett visst laboratorium.

52. Lever-, parvisa njur- och parvisa adrenalvikter är valfria mått. Återigen bör vävnaderna putsas från tillhörande bindvävshinnor och fett. Levern bör vägas och registreras med en noggrannhet på 0,1 g och de pariga njurarna och pariga binjurarna ska vägas och registreras med en noggrannhet på 0,1 mg. Levern, njurarna och binjurarna påverkas inte bara av androgener, utan är också användbara mätare på systemisk toxicitet.

▼**M5**

53. Mätning av serumluteiniserande hormon (LH), follikelstimulerande hormon (FSH) och testosteron (T) är valfritt. T-serumnivåerna är användbara för att avgöra om testkemikalien orsakar levermetabolism av testosteron och sänker serumnivåerna. Utan T-data kan en sådan effekt verka vara en antiandrogen mekanism. LH-nivåer ger information om förmågan hos en antiandrogen att inte bara minska organvikterna, utan också påverka hypotalamus-hypofysfunktionen, vilket i långtidsstudier kan orsaka testikeltumörer. FSH är ett viktigt hormon för spermatogenes. Serum T4 och T3 är också valfria mått som kan ge användbar kompletterande information om förmågan att störa sköldkörtelhormonbalansen. Om hormonmätningar ska göras bör råttorna bedövas före obduktionen och blod tas från hjärtat, och narkosmetoden väljas med omsorg så att den inte påverkar hormonmätningen. Framställningsmetoden för serumet, källan till radioimmunanalys eller andra mätningsutrustningar, analysmetoder och resultat bör registreras. LH-nivåer ska rapporteras som ng per ml serum, och T bör också redovisas som ng per ml serum.

54. Dissektionen av vävnaderna beskrivs enligt följande med en utförlig dissektionsvägledning med bilder som publiceras som kompletterande material som en del av valideringsprogrammet (se hänvisning 21). En dissektionsvideo finns också tillgänglig från webbsidan för *Korea Food and Drug Administration* (se hänvisning 22).

— Med den ventrala ytan på djuret uppåt, fastställ om förhuden på penis har separerats från ollonet. Om så är fallet, dra tillbaka förhuden och avlägsna ollonet, väg (med en noggrannhet på 0,1 mg) och notera vikten.

— Öppna bukens hud och vägg så att de inre organen exponeras. Om de valfria organen vägs, ta bort och väg levern med en noggrannhet på 0,1 g, ta bort mage och tarmar, ta bort och väg de pariga njurarna och pariga binjurarna med en noggrannhet på 0,1 mg. Denna dissektion exponerar blåsan och påbörjar dissektionen av de hanliga tillhörande målvävnaderna.

— För att dissekera VP, separera blåsan från det ventrala muskellagret genom att skära bindvävnaden längs mittlinjen. Förskjut blåsan anteriort mot sädesblåsorna (SV), så att vänster och höger lob på den ventrala prostatan visas (täckt med ett lager av fett). Ta försiktigt bort fettet från höger och vänster lob på den ventrala prostatan. Förskjut försiktigt den ventrala prostatans högra lob från urinröret och dissekera loben från urinröret. Fortsätt hålla den ventrala prostatans högra lob, förskjut försiktigt den ventrala prostatans vänstra lob från urinröret och dissekera sedan, väg med en noggrannhet på 0,1 mg och notera vikten.

— För att dissekera SVCG, förskjut blåsan kaudalt, exponera sädesledaren och sädesblåsornas högra och vänstra lob samt koagulerande körtlar (SVCG). Förhindra läckage av vätska genom att spänna fast en hemostat vid basen av SVCG där sädesledaren ansluter sig till urinröret. Dissekera försiktigt SVCG, och med hemostaten på plats putsa bort fett och närliggande organ, placera i ett tarerat vikttråg, ta bort hemostaten och väg med en noggrannhet på 0,1 mg och registrera vikten.

▼M5

— För att dissekera levator ani samt bulbocavernosusmuskler (LABC), exponeras musklerna och penisbasen. LA-musklerna är lindade runt tjocktarmen, medan de främre LA- och BC-musklerna är fästade vid penislökarna. Huden och närliggande organ från den perianala regionen som sträcker sig från basen på penis till främre delen av anus tas bort. BC-musklerna dissekeras gradvis från penisbulberna och -vävnaderna. Grovtarmen skärs i två delar och hela LABC kan dissekeras och tas bort. LABC bör putsas från fett och närliggande organ, vägas med en noggrannhet på 0,1 mg, och vikten ska registreras.

— Efter att LABC tagits bort, är de runda Cowpers körtlar (COW) synliga vid basen av, och något dorsal till, penisbulberna. Noggrann dissekering krävs för att undvika snitt i den tunna kapseln och förhindra vätskeläckage. Väg COW parvis med en noggrannhet på 0,1 mg, och registrera vikten.

— Dessutom, om vätska förloras genom någon körtel under obduktion och dissektion bör detta registreras.

55. Om utvärderingen av varje kemikalie kräver obduktion av fler djur än vad som är rimligt under en enda dag, kan studiens start delas upp på två på varandra följande dagar, så att obduktionen och arbetet fördelas på två dagar. Om de fördelas på detta sätt bör hälften av djuren per behandlingsgrupp användas per dag.

56. Kropparna ska omhändertas på lämpligt sätt efter obduktionen.

RAPPORTERING

Data

57. Data bör rapporteras individuellt (dvs. kroppsvikt, tillhörande könsvävnaders vikter, valfria mätningar samt andra responser och observationer) för varje grupp av djur (medelvärden och standardavvikelser beräknas för alla gjorda mätningar). Data bör sammanfattas i tabellform. Data ska visa antalet djur vid testets början, antal djur som hittats döda under testet eller som visat tecken på toxicitet, en beskrivning av de tecken på toxicitet som observerats, inklusive tidpunkt för första tecken, varaktighet och omfattning.

58. En slutrapport bör innehålla:

Testanläggning

— Namn på anläggning, adress.

— Försöksledaren och annan personal samt deras studieansvar.

— Respektive datum då studien började och slutade, dvs. den första dagen testkemikalien administrerades och den sista obduktionsdagen.

Testkemikalie

— Källa, parti-/batchnummer, identitet, renhet, leverantörens fullständiga adress och karakterisering av testkemikalien.

— Fysikalisk form och, när så är tillämpligt, fysikalisk-kemikaliska egenskaper.

— Förvaringsförhållanden samt metod och frekvens för framställning av utspädningar.

— Eventuella stabilitetsdata som genererats.

— Eventuella analyser av doseringslösningar/-suspensioner.

▼**M5**

Vehikel

— Karakterisering av vehikeln (identitet, leverantör och parti-#).

— Motivering för val av vehikel (om annan än vatten).

Försöksdjur och djurhållningsförfaranden

— Art/stam som används samt motivering av val.

— Ursprung eller leverantör av djuren, inklusive fullständig adress.

— Försöksdjurens antal och ålder.

— Inhysningsförhållanden (temperatur, belysning osv.).

— Foder (namn, typ, leverantör, partinummer, innehåll och, om det är känt, fytoöstrogennivåer).

— Strö (namn, typ, leverantör, innehåll).

— Burförhållanden och antalet djur per bur.

Testbetingelser

— Ålder vid kastrering och acklimatiseringens varaktighet efter kastrering.

— De enskilda djurens vikt vid studiens början (med en noggrannhet på 0,1 g).

— Randomiseringsprocess och en dokumentation av anvisning till vehikel-, referens-, testkemikaliegrupper och burar.

— Medelvärde och standardavvikelse för kroppsvikterna hos varje grupp varje vägningsdag under hela studien.

— Motivering för valet av dos.

— Administrering av testkemikalien samt motivering för valet av exponeringsväg.

— För test av antiandrogenicitet: TP-behandling (dos och volym).

— Testkemikaliebehandling (dos och volym).

— Tidpunkt för dosering.

— Obduktionsförfaranden, inklusive blodtömningssätt och eventuell narkos.

— Vid serumanalyser bör uppgifter om metoden lämnas. Om till exempel RIA används, ska RIA-förfarandet, RIA-satsernas ursprung, satsernas förfallodatum, förfarandet för scintillationsräkningen och standardiseringen rapporteras.

Resultat

— Dagliga observationer av varje djur under dosering, inklusive:

— Kroppsvikter (med en noggrannhet på 0,1 g).

— Kliniska tecken (om några).

— Eventuella mätningar eller noteringar gällande födointag.

— Obduktionsobservationer av varje djur, inklusive:

▼M5

— Datum för obduktion.

— Djurbehandlingsgrupp.

— Djur-ID.

— Prosektor.

— Tid på dagen då obduktion och dissektion utförs.

— Djurens ålder.

— Slutlig kroppsvikt vid obduktionen, notera eventuell statistisk signifikant ökning eller minskning.

— Arbetsordning för djurens blodtömning och dissektion vid obduktionen.

— Vikter hos de fem androgenberoende målvävnaderna:

— Ventral prostata (med en noggrannhet på 0,1 mg).

— Sädesblåsor samt koagulerande körtlar, inklusive vätska (parvis, med en noggrannhet på 0,1 mg).

— Levator ani samt bulbocavernosus muskelkomplex (med en noggrannhet på 0,1 mg).

— Cowpers körtlar (färsk vikt – parvis, med en noggrannhet på 0,1 mg).

— Ollon (färsk vikt med en noggrannhet på 0,1 mg).

— Vikter på valfria vävnader, om de utförs:

— Lever (med en noggrannhet på 0,1 g).

— Njure (parvis, med en noggrannhet på 0,1 mg).

— Binjure (parvis, med en noggrannhet på 0,1 mg).

— Allmänna synpunkter och kommentarer.

— Analyser av serumhormoner, om de utförs.

  — LH-Serum (tillval – ng per ml serum), och

  — T-Serum T (tillval – ng per ml serum).

— Allmänna synpunkter och kommentarer.

Sammanställning av data

Data bör sammanställas i tabellform och innehålla urvalsstorlek för varje grupp, genomsnittliga värden, och standardfel för medelvärdet eller standardavvikelsen. Tabeller bör innehålla obduktionskroppsvikter, kroppsviktförändringar från början av doseringen fram till obduktionen, vikter för accessoriska könsvävnader och eventuella vikter för valfria organ.

Diskussion av resultaten

Analys av resultaten

59. Kropps- och organvikter vid obduktionen bör analyseras statistiskt avseende egenskaper såsom homogen varians, med lämpliga dataomvandlingar vid behov. Behandlingsgrupperna bör jämföras med en kontrollgrupp med användning av tekniker såsom ANOVA följt av parvisa jämförelser (t.ex. Dunnetts asymmetriska test) och kriteriet för statistisk skillnad, till exempel $p \leq 0,05$. De grupper som uppnår statistisk signifikans bör identifieras. Dock bör ”relativa organ”-vikter undvikas på grund av de ogiltiga statistiska antaganden som ligger bakom denna datamanipulation.

▼M5

60. För androgena agonister ska kontrollen vara testgruppen för endast vehikel. Verkningsmekanismen hos en testkemikalie kan leda till olika relativa responser bland vävnaderna, t.ex. trenbolon, vilken inte kan 5-alfa-reduceras, och som har mer uttalade effekter på LABC och GP än vad TP har. En statistiskt signifikant ökning ($p \leq 0,05$) av två eller fler av de fem androgenberoende målvävnadsvikterna (VP, LABC, GP, CG och SVCG) bör betraktas som ett positivt androgenagonistresultat, och alla målvävnader bör visa en viss grad av ökad tillväxt. Kombinerad utvärdering av vävnadsresponser hos samtliga accessoriska könsorgans (ASO) kan uppnås med hjälp av en lämplig multivariat dataanalys. Detta skulle kunna förbättra analysen, speciellt i de fall där endast en enda vävnad ger ett statistiskt signifikant svar.

61. För androgen antagonism bör kontrollen vara referensandrogentestgruppen (endast testosteronpropionat). Verkningssättet hos en testkemikalie kan leda till olika relativa responser bland vävnaderna, t.ex. 5 α-reduktashämmare, såsom finasterid, har mer uttalade effekter på den ventrala prostatan än andra vävnader jämfört med potenta AR-antagonister, såsom flutamid. En statistiskt signifikant minskning ($p \leq 0,05$) i två eller flera av de fem androgenberoende målvävnadsvikterna (VP, LABC, GP, CG och SVCG) i förhållande till enbart TP-behandling bör betraktas som ett positivt androgenantagonistresultat, och samtliga målvävnader bör visa en viss grad av minskad tillväxt. Kombinerad utvärdering av samtliga ASO-vävnadsresponser kan uppnås med hjälp av en lämplig multivariat dataanalys. Detta skulle kunna förbättra analysen, speciellt i de fall där endast en enda vävnad ger ett statistiskt signifikant svar.

62. Data bör sammanställas i tabellform och innehålla medelvärde, standardfel för medelvärdet (standardavvikelse skulle också kunna accepteras) och urvalsstorlek för varje grupp. Individuella datatabeller bör också ingå. De enskilda värdena, medelvärde, SE (SD) och CV-värden för kontrolldata bör undersökas, för att avgöra om de uppfyller acceptabla kriterier för överensstämmelse med förväntade historiska värden. För variationskoefficienter, som överstiger CV-värden som anges i tabell 1 (se punkterna 25 och 26) för varje organvikt, bör man fastställa om det finns fel i dataregistreringen eller posten, eller om laboratoriet ännu inte behärskar en korrekt dissektion av androgenberoende vävnader, och om ytterligare utbildning/praktik är motiverad. I allmänhet är variationskoefficienter (standardavvikelsen dividerad med medelvärdet för organvikten) repeterbara från laboratorium till laboratorium och studie till studie. Data som presenteras bör minst omfatta: ventrala prostatan, sädesblåsor, levator ani samt bulbocavernosus, Cowpers körtlar, ollon, lever, samt kroppsvikter och kroppsviktsförändringar från början av doseringen fram till obduktionen. Data kan även presenteras efter kovariansjustering av kroppsvikt, men bör inte ersätta presentation av ej justerad data. Och om preputial separation (PPS) inte förekommer i någon av grupperna, bör förekomsten av PPS registreras och jämföras statistiskt med kontrollgruppen med hjälp av Fishers exakta test.

▼**M5**

63. Vid kontroll av datorns dataposter med de ursprungliga databladen avseende noggrannhet, bör organviktsvärden som inte är biologiskt rimliga eller varierar med mer än tre standardavvikelser från behandlingsgruppen medelvärden, granskas noga och kan behöva uteslutas eftersom de sannolikt beror på registreringsfel.

64. Jämförelse av studieresultaten med OECD:s CV-värden (i tabell 1) är ofta ett viktigt steg i tolkningen beträffande valideringen av studieresultaten. Historiska data för vehikelkontrollgrupperna bör bevaras i laboratoriet. Historiska data för responser på positiva referenskemikalier, såsom TP och FT, bör också bevaras i laboratoriet. Laboratorier kan också regelbundet testa responsen på kända svaga androgena agonister och antagonister och bevara dessa uppgifter. Dessa uppgifter kan jämföras med tillgängliga OECD-data för att säkerställa att laboratoriets metoder ger tillräcklig statistisk precision och styrka.

▼**M5**

Tillägg 1

DEFINITIONER

Androgen: en term som används för att beskriva en positiv inverkan på tillväxten av androgenberoende vävnader.

Antiandrogenicitet: förmågan hos en kemikalie att undertrycka verkan av TP i en däggdjursorganism.

Kemikalie: ett ämne eller en blandning.

Födelsedatum: postnatal dag 0.

Dos: den mängd testkemikalie som administreras. För Hershbergers bioassay uttrycks dosen som vikten testkemikalie per enhet kroppsvikt hos försöksdjuret per dag (t.ex. mg/kg kroppsvikt/dag).

Dosering: en allmän term som omfattar dos, dess frekvens samt doseringens varaktighet.

Döende: en term som används för att beskriva ett djur i döende tillstånd, dvs. nära döden.

Postnatal dag X: den X:e dagen i livet efter födelsedatum.

Känslighet: förmågan hos en testmetod att korrekt identifiera kemikalier som har den egenskap som de testas för.

Specificitet: förmågan hos en testmetod att korrekt identifiera kemikalier som inte har den egenskap som de testas för.

Testkemikalie: varje ämne eller blandning som testas med denna testmetod.

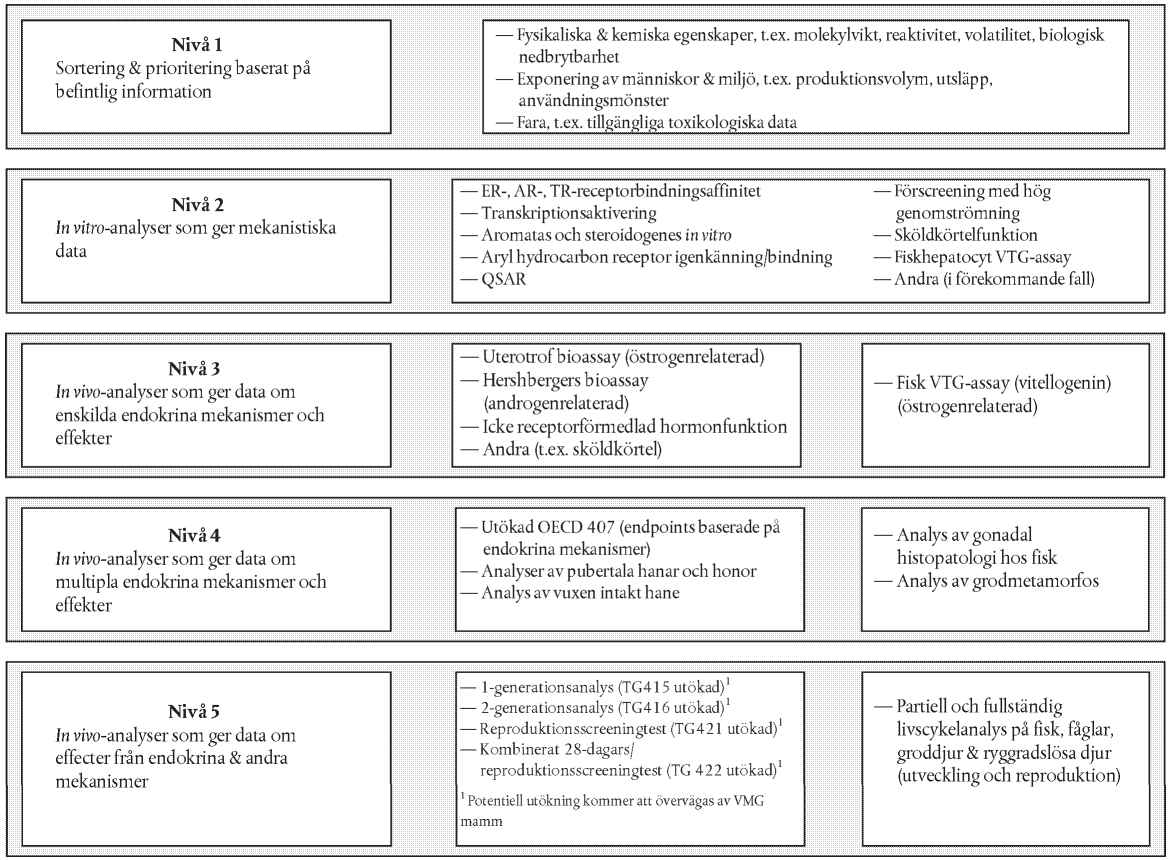
Validering: en vetenskaplig process utformad för att karakterisera de operativa kraven och begränsningarna hos en testmetod och visa dess tillförlitlighet och relevans för ett visst ändamål.

▼M5

Tillägg 2

Notera: Dokument utarbetat av testriktlinjeprogrammets sekretariat baserat på den överenskommelse som nåddes vid EDTA-arbetsgruppens 6:e möte

OECD:s konceptuella ram för testing och bedömning av endokrinstörande kemikalier



VMG mamm: Validation Management Group on Mammalian Testing and Assessment

02008R0440 — SV — 18.05.2017 — 007.001 — 889

▼**M5**

NOTER TILL RAMEN

Not 1: Inmatning på alla nivåer och utmatning på alla nivåer är möjlig och beror på typ av befintliga informationsbehov för fara och riskbedömningsändamål.

Not 2: På nivå 5, bör ekotoxikologi omfatta endpoints som anger mekanismer för biverkningar och potentiella populationsskador.

Not 3: När en multimodal modell täcker flera av de enskilda endpointtesterna, ersätter denna modell användningen av de enskilda endpointtesterna.

Not 4: Bedömningen av varje kemikalie bör baseras på en bedömning från fall till fall, med beaktande av all tillgänglig information, med hänsyn till funktionen hos de övergripande nivåerna.

Not 5: Ramen bör för närvarande inte betraktas som heltäckande. På nivå 3, 4 och 5 finns det tester som antingen är tillgängliga, eller för vilken ett godkännande pågår. När det gäller den senare, ingår dessa preliminärt. När de väl har utvecklats och validerats, kommer de formellt att läggas till ramen.

Not 6: Nivå 5 bör inte betraktas som att den endast omfattar slutgiltiga tester. Tester som ingår på den nivån anses bidra till allmän faro- och riskbedömning.

HÄNVISNINGAR

1. OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10–11 mars 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 och Ostby JS (2005). Hershberger assay to investigate the effects of endocrine disrupting compounds with androgenic and antiandrogenic activity in castrate-immature male rats. I: *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. I: 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, s 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. See, section II, The dissection guidance provided to the laboratories: http://www.ehponline.org/docs/2006/8751/suppl.pdf

22. Korea Food and Drug Administration. Visual reference guide on Hershberger assay procedure, including a dissection video. 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. Europaparlamentets och rådets direktiv 2010/63/EU av den 22 september 2010 om skydd av djur som används för vetenskapliga ändamål (EUT L 276, 20.10.2010, s. 33).

27. Följande kapitel i denna bilaga:

B.1a, Akut toxicitet (oralt) – metod med fasta särskiljande doser

B.1b, Akut toxicitet (oralt) – metod för bestämning av akut toxicitetsklass

▼M5

B.56 UTÖKAD ENGENERATIONSSTUDIE AV REPRODUKTIONSTOXICITET

INLEDNING

1. Denna testmetod motsvarar OECD:s testriktlinje (TG) 443 (2012). Den är baserad på förslaget från *Agricultural Chemical Safety Assessment (ACSA) Technical Committee* inom *ILSI Health and Environmental Sciences Institute (HESI)* om en utökad engenerationsstudie av reproduktion i livsskede F_1, publicerat i Cooper et al., 2006 (se hänvisning 1). Flera förbättringar och förtydliganden har gjorts i studieutformningen för att ge flexibilitet och betona vikten av att börja med befintlig kunskap och använda observationer av levande djur för att styra och skräddarsy testningen. Denna testmetod ger en detaljerad beskrivning av det operativa genomförandet av en utökad engenerationsstudie av reproduktionstoxicitet. Testmetoden beskriver tre kohorter för F_1-djur:

Kohort 1: Bedömer reproduktiva/utvecklingsmässiga endpoints. Denna kohort kan utvidgas till att omfatta en F_2-generation.

Kohort 2: Bedömer eventuella effekter av kemisk exponering av ett nervsystem under utveckling.

Kohort 3: Bedömer eventuella effekter av kemisk exponering av ett immunsystem under utveckling.

2. Beslut om bedömningen av andra generationen och utelämningen av den utvecklingsmässiga neurotoxicitetskohorten och/eller utvecklingsmässiga immunotoxicitetskohorten bör återspegla befintlig kunskap för den kemikalie som utvärderas, liksom behoven av olika tillsynsmyndigheter. Syftet med testmetoden är att ge information om hur studien kan utföras och hur varje kohort ska utvärderas.

3. Förfarande för beslutet om den interna triggningen för att producera en andra generation beskrivs i OECD:s vägledning 117 (se hänvisning 39) för de tillsynsmyndigheter som använder interna triggers.

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN OCH MÅL

4. Huvudsyftet med den utökade engenerationsstudien av reproduktionstoxicitet är att utvärdera specifika livsstadier som inte omfattas av andra typer av toxicitetsstudier, och tester av effekter som kan uppstå till följd av pre- och postnatal kemisk exponering. För reproduktiva endpoints är det tänkt att, som ett första steg och när det är tillgängligt, information från studier med upprepad dosering (inklusive screening av reproduktionstoxicitetsstudier, t.ex.OECD:s TG 422 [se hänvisning 32]), eller kortvariga screeningtester av endokrinstörande ämnen (t.ex.uterotrof assay – testmetod B.54 [se hänvisning 36] och Hershbergers bioassay – testmetod B.55 [se hänvisning 37]) används för att påvisa effekter på fortplantningsorganen hos hanar och honor. Detta kan inkludera spermatogenesen (testikelhistopatologi) för hanar, och brunstcykler, follikelantal/oocytmognad och äggstocksintegritet (histopatologi) för honor. Den utökade engenerationsstudien av reproduktionstoxicitet fungerar sedan som ett test för reproduktionsendpoints som kräver interaktion mellan hanar och honor, honor och befruktade ägg, honor och avkomma samt F_1-generationen tills efter könsmognaden (se OECD:s vägledning 151 som stöder denna testmetod [hänvisning 40]).

▼M5

5. Testmetoden är utformad för att ge en utvärdering av kemikaliers pre- och postnatala effekter på utvecklingen, såväl som en grundlig utvärdering av systemisk toxicitet hos dräktiga och lakterande honor samt ung och vuxen avkomma. Detaljerad undersökning av viktiga utvecklingsendpoints, såsom avkommans levnadsduglighet, neonatala hälsa, utvecklingsstatus vid födseln samt fysisk och funktionell utveckling upp till vuxen ålder, förväntas identifiera specifika målorgan hos avkomman. Vidare kommer studien att ge och/eller bekräfta information om en testkemikalies effekter på integritet och prestanda hos vuxna hanars och honors fortplantningssystem. Specifikt, men inte endast, beaktas följande parametrar: gonadfunktion, brunstcykel, epididymal spermiemognad, parningsbeteende, befruktning, dräktighet, förlossning och laktation. Dessutom kommer information som erhålls från bedömningar av utvecklingsneurotoxicitet och immunotoxicitet att karakterisera potentiella effekter på dessa system. Data som härrör från dessa tester bör göra det möjligt att bestämma nivåer där ingen skadlig effekt observeras (Noael), lägsta observerade effektnivåer (Loael) och/eller referensdoser för olika endpoints och/eller användas för att karakterisera effekter som upptäckts i föregående studier med upprepad dosering, och/eller fungera som en vägledning för efterföljande testning.

6. En översikt över protokollet presenteras i figur 1. Testkemikalien administreras kontinuerligt i graderade doser till flera grupper av könsmogna hanar och honor. Denna föräldrageneration (P) doseras under en bestämd period före parningen (väljs på basis av den information som finns tillgänglig om testkemikalien, men minst två veckor) samt en parningsperiod på två veckor. P-hanarna fortsätter att behandlas, åtminstone till avvänjningen av F_1. De bör behandlas i minst 10 veckor. De kan behandlas längre om det finns ett behov av att klargöra effekter på reproduktionen. Behandlingen av P-honorna fortsätter under dräktighet och laktation fram till avslutningen, efter avvänjningen av deras kullar (dvs.8–10 veckors behandling). F_1-avkomman får ytterligare behandling med testkemikalien, från avvänjningen upp till vuxen ålder. Om en andra generation bedöms (se OECD:s vägledningsdokument 117 [hänvisning 39]), kommer F_1-avkomman att hållas kvar på behandling till avvänjningen av F_2, eller fram till studiens avslutning.

7. Kliniska observationer och patologiska undersökningar utförs på alla djur efter tecken på toxicitet, med särskild tonvikt på hos de hanliga och honliga fortplantningssystemens integritet och prestanda samt avkommans hälsa, tillväxt, utveckling och funktion. Vid avvänjningen tilldelas den valda avkomman till specifika undergrupper (kohorter 1–3, se punkterna 33 och 34 samt figur 1) för ytterligare undersökningar, inklusive könsmognad, integritet och funktion hos fortplantningsorganen, neurologiska och beteendemässiga endpoints samt immunförsvaret.

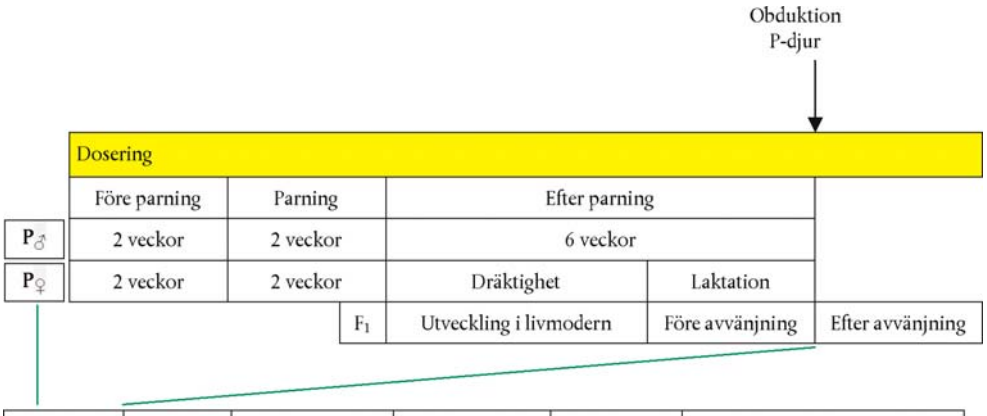
8. Vid genomförandet av cancerogenitetsstudien bör man alltid följa de vägledande principer och överväganden som beskrivs i OECD:s vägledning nr 19 om erkännandet, bedömningen och användningen av kliniska tecken som humana endpoints för försöksdjur som används för säkerhetsbedömningar (se hänvisning 34).

▼M5

9. När tillräckligt många studier finns tillgängliga för att utröna effekterna av den nya studieutformningen, kommer testmetoden att ses över och vid behov revideras i ljuset av de erfarenheter som gjorts.

Figur 1

Schema för den utökade engenerationsstudien av reproduktionstoxicitet



Föräldra-generation	Kohort	Benämning	Djur/kohort	Könsmognad	Ungefärlig ålder vid obduktion (veckor)
Målet är 20 kullar per grupp	1A	Reproduktiv	20 M + 20 F	Ja	13
	1B	Reproduktiv	20 M + 20 F	Ja	14 eller 20–25 om detta utlöses
	2A	Neurotoxicitet	10 M + 10 F @	Ja	11-12
	2B	Neurotoxicitet	10 M + 10 F @	Nej	3
	3	Immunotoxicitet	10 M + 10 F @	Ja	8
	Överskott	Reserver		Nej	3

@ en per kull och representativt för 20 kullar totalt, om möjligt

BESKRIVNING AV METODEN OCH FÖRBEREDELSER FÖR TESTET

Djur

Val av djurart och stam

10. Valet av art för testning av reproduktionstoxicitet bör noggrant övervägas i ljuset av all tillgänglig information. På grund av den stora mängden bakgrundsdata och jämförbarheten med allmänna toxicitetstester är dock råttan normalt sett den art som föredras, och kriterierna och rekommendationerna som ges i den här testmetoden avser denna art. Om en annan art används bör detta motiveras, och lämpliga ändringar av protokollet blir nödvändiga. Stammar med låg fertilitet eller välkänt höga förekomster av spontana utvecklingsdefekter ska inte användas.

Ålder, kroppsvikt och inklusionskriterier

11. Friska föräldradjur som inte har utsatts för tidigare försökförfaranden bör användas. Både hanar och honor bör studeras, och honorna får inte ha fött ungar eller vara dräktiga. P-djuren bör vara könsmogna med liknande vikt (inom könet) vid doseringens inledning, liknande ålder (cirka 90 dagar) vid parningen, och representativa för den art och stam som studeras. Djur bör acklimatiseras under minst 5 dagar efter ankomsten. Djuren anvisas slumpvis till kontroll- och behandlingsgrupperna, på ett sätt som resulterar i jämförbara genomsnittliga kroppsviktsvärden bland grupperna (dvs.± 20 % av medelvärdet).

▼M5

Inhysnings- och utfodringsförhållanden

12. Temperaturen i djurutrymmet bör vara 22 °C (± 3 °C). Den relativa fuktigheten bör vara 30–70 %, med ett idealiskt intervall på 50–60 %. Artificiell belysning bör ställas in på 12 timmar ljus, 12 timmar mörker. Konventionellt laboratoriefoder kan användas med fri tillgång till dricksvatten. Fodrets innehåll av fytoöstrogener bör beaktas noga, eftersom en hög nivå av fytoöstrogener i fodret kan påverka vissa reproduktiva endpoints. Standardiserat ”open-formula”-foder där östrogena kemikalier har reducerats rekommenderas (se hänvisning 2, 30). Valet av foder kan påverkas av behovet av att säkerställa en lämplig blandning av en testkemikalie när den administreras genom denna metod. Innehåll, homogenitet och stabilitet av testkemikalien i fodret bör verifieras. Fodret och dricksvattnet bör analyseras regelbundet avseende föroreningar. Prover av varje fodersats som används under studien bör lagras under lämpliga förhållanden (t.ex.frysta vid – 20 °C) tills rapporten färdigställs, om resultaten kräver en ytterligare analys av fodrets ingredienser.

13. Djuren bör inhysas i burar, i små grupper bestående av samma kön och behandlingsgrupp. De kan inhysas individuellt för att undvika eventuella skador (t.ex. hanar efter parningsperioden). Parningsförfarandena bör utföras i lämpliga burar. Efter tecken på parning inhyses honorna, som antas vara dräktiga, separat i förlossnings- eller moderskapsburar som är försedda med lämpliga och definierade bomaterial. Kullarna är inhysta tillsammans med sina mödrar fram till avvänjningen. F_1-djur bör hållas i små grupper av samma kön och behandlingsgrupp från avvänjningen till studiens avslutning. Om det är vetenskapligt motiverat kan djuren inhysas individuellt. Det valda strömaterialets innehåll av fytoöstrogener ska vara minimalt.

Djurens antal och identifiering

14. Normalt bör varje test- och kontrollgrupp innehålla ett tillräckligt antal par som parar sig för att ge minst 20 dräktiga honor per dosgrupp. Målet är att producera tillräckligt med dräktiga honor för att säkerställa en meningsfull utvärdering av kemikaliens potential att påverka fertilitet, dräktighet och moderbeteende i P-generationen, samt F_1-avkommans tillväxt och utveckling från befruktning till mognad. Om det önskade antalet dräktiga djur inte uppnås behöver studien inte nödvändigtvis ogiltigförklaras, och bör utvärderas från fall till fall med tanke på ett eventuellt orsakssamband med testkemikalien.

15. Varje P-djur tilldelas ett unikt ID-nummer innan doseringen påbörjas. Om laboratoriets historiska data tyder på att en betydande andel honor inte kan uppvisa regelbundna (4 eller 5 dagar) brunstcykler, rekommenderas en bedömning av brunstcykler före behandlingsstarten. Alternativt kan gruppens storlek ökas för att säkerställa att minst 20 honor i varje grupp ska ha regelbundna (4 eller 5 dagar) brunstcykler vid början av behandlingen. All F_1-avkomma identifieras unikt vid första undersökningen av nyfödda på postnatal dag (PND) 0 eller 1. Dokument indikerar att ursprungskullen bör bibehållas för alla F_1-djur, och F_2-djur i förekommande fall, genom hela studien.

▼M5

Testkemikalie

Tillgänglig information om testkemikalien

16. Genomgång av befintlig information är viktig för beslut om administrationsätt, val av vehikel, val av djurart, val av dos och potentiella ändringar av doseringsschemat. Följaktligen bör all relevant tillgänglig information om testkemikalien, dvs. fysikalisk-kemiska, toxikokinetiska (inklusive artspecifik metabolism), toxikodynamiska egenskaper, struktur-aktivitetssamband (SAR), *in vitro* metaboliska processer, resultat från tidigare studier om toxicitet och relevant information om strukturella analoger beaktas i planeringen av den utökade engenerationsstudien av reproduktionstoxicitet. Preliminär information om absorption, distribution, metabolism och eliminering (Adme) och bioackumulerbarhet kan härröra från kemisk struktur, fysikalisk-kemiska data, grad av plasmaproteinbindning eller toxikokinetiska (TK) studier, medan resultat från toxicitetsstudier ger ytterligare information, t.ex.om Noael, metabolism eller induktion av metabolism.

Beaktande av toxikokinetiska data

17. Även om det inte behövs så är TK-data från tidigare utförda dosfinnande studier eller andra studier mycket användbara i planeringen av studiens utformning, val av dosnivåer samt tolkning av resultaten. Av särskild nytta är uppgifter som 1) verifierar exponeringen av testkemikalien på foster under utveckling samt på ungar (eller relevanta metaboliter), 2) gör en uppskattning av intern dosimetri, och 3) utvärderar potentiell dosberoende mättnad av kinetiska processer. Ytterligare TK-data, t.ex. metabolitprofiler, koncentration-tidsförlopp etc. bör också övervägas, om de finns tillgängliga. Kompletterande TK-data kan också samlas in under huvudstudien, förutsatt att det inte stör insamlingen och tolkningen av huvudstudiens endpoints.

Som en allmän vägledning kan följande TK-datauppsättning vara användbar i planeringen av den utökade engenerationsstudien av reproduktionstoxicitet:

— Under sen dräktighet (t.ex. dräktighetsdag 20) – maternellt blod och foetalt blod.

— Mitt i laktationen (PND 10) – maternellt blod, blod från ungar och/eller mjölk.

— Strax efter avvänjningen (t.ex. PND 28) – blodprov från avvanda ungar.

Flexibilitet bör användas för att fastställa de specifika analyterna (t.ex. överordnade kemikalier och/eller metaboliter), samt provtagningsschema. Till exempel så är antal och tidpunkt för provtagningar på en viss provtagningsdag beroende av exponeringsvägen och tidigare kunskap om TK-egenskaper hos icke-dräktiga djur. För födostudier är provtagning vid en bestämd tidpunkt under var och en av dessa dagar tillräcklig, medan dosering via sondmatning kan motivera ytterligare provtagningstidpunkter för att få en bättre uppskattning av antalet interna doser. Emellertid är det inte nödvändigt att generera ett fullständigt koncentrations-tidsförlopp på någon av provtagningsdagarna. Vid behov kan blod från djur av samma kön inom kullarna slås samman för fetala och neonatala analyser.

▼M5

Administrationssätt

18. Valet av administrationssätt bör ta hänsyn till det som är mest relevant för människors exponering. Även om protokollet är avsett för administration av testkemikalien genom födan kan det modifieras för administration via andra vägar (dricksvatten, sondmatning, inandning, hudkontakt) beroende på kemikaliens egenskaper och den information som krävs.

Val av vehikel

19. Vid behov kan testkemikalien upplösas eller suspenderas i en lämplig vehikel. Det rekommenderas att, om möjligt, användningen av en vattenhaltig lösning/suspension beaktas först, följt av övervägandet om att använda en lösning/suspension i olja (t.ex.majsolja). För andra vehiklar än vatten bör de toxiska egenskaperna vara kända. Användningen av en vehikel med potentiell inneboende toxicitet (t.ex.aceton, DMSO) bör undvikas. Testkemikaliens stabilitet i vehikeln bör bestämmas. Följande egenskaper bör beaktas om en vehikel eller annan tillsats används för att underlätta dosering: effekter på absorption, distribution, metabolism eller kvarhållande av testkemikalien; effekter på de kemiska egenskaperna hos testkemikalien som kan förändra dess toxiska egenskaper och effekter på foder eller vatten, eller djurens näringsstatus.

Val av dos

20. Normalt bör studien omfatta minst tre dosnivåer och en jämsides behandlad kontrollgrupp. Vid val av lämpliga dosnivåer bör utredaren analysera all tillgänglig information, inklusive doseringsinformation från tidigare studier, TK-data från dräktiga eller icke-dräktiga djur, omfattningen av överföring genom digivning och uppskattningar av människors exponering. Om TK-data finns tillgängliga som tyder på dosberoende mättnad av TK-processer, bör försiktighet iakttas för att undvika höga dosnivåer som tydligt uppvisar mättnad, förutsatt naturligtvis att mänsklig exponering förväntas ligga väl under mättnadspunkten. I sådana fall bör den högsta dosen vara på, eller strax över, brytpunkten för övergången till olinjärt TK-beteende.

21. I brist på relevanta TK-data bör dosnivåerna baseras på toxiska effekter, om de inte begränsas av testkemikalien fysikaliska/kemiska beskaffenhet. Om dosnivåerna baseras på toxicitet bör den högsta dosen väljas i syfte att inducera viss systemisk toxicitet, men inte dödsfall eller allvarligt lidande för djuren.

22. Fallande dosnivåer bör väljas för att påvisa en eventuell dosrelaterad effekt och för att fastställa Noael eller doser nära detektionsgränsen som gör det möjligt att härleda en referensdos för den känsligaste endpointen. För att undvika stora dosavstånd mellan Noael och Loael är ofta två- eller fyrfaldiga dosintervall optimala. Tillägget av en fjärde testgrupp är att föredra framför användningen av ett mycket stort intervall (t.ex. mer än en faktor på 10) mellan doserna.

23. Med undantag av behandlingen med testkemikalien hanteras djuren i kontrollgruppen på exakt samma sätt som i testgruppen. Denna grupp bör vara obehandlad, placebobehandlad eller en vehikelkontrollgrupp, om en vehikel används för administrering av testkemikalien. Om en vehikel används bör kontrollgruppen tillföras vehikeln i den största volym som används.

▼M5

Toleranstest

24. Om det inte finns några tecken på toxicitet vid en dos på minst 1 000 mg/kg kroppsvikt/dag i studier med upprepad dosering, eller om toxicitet inte förväntas baserat på data från strukturellt och/eller metaboliskt besläktade kemikalier, vilket indikerar likhet i metaboliska egenskaper *in vivo*/*in vitro*, är en studie med flera dosnivåer inte nödvändig. I sådana fall kan den utökade engenerationsstudien av reproduktionstoxicitet genomföras med hjälp av en kontrollgrupp och en enda dos på minst 1 000 mg/kg kroppsvikt/dag. Dock, skulle evidens för reproduktions- eller utvecklingstoxicitet finnas vid denna gränsdos, kommer ytterligare studier vid lägre dosnivåer att krävas för att identifiera ett Noael-värde. Dessa toleranstestsövervägaganden gäller endast när mänsklig exponering inte indikerar ett behov av en högre dosnivå.

FÖRFARANDEN

Exponering av avkomma

25. Intag via föda är det föredragna administrationssättet. Om sondmatningsstudier utförs bör det noteras att ungarna normalt endast får testkemikalien indirekt via mjölken, tills direkt dosering startar vid deras avvänjning. I foder- eller dricksvattenstudier kommer ungarna dessutom att få testkemikalien direkt när de börjar äta själva under den sista veckan av laktationsperioden. Ändringar av studiens utformning bör övervägas när utsöndringen av testkemikalien i mjölk är dålig, och det saknas bevis för en kontinuerlig exponering av avkomman. I dessa fall bör man överväga direkt dosering av ungarna under laktationsperioden baserat på tillgänglig TK-information, toxicitet hos avkomman eller förändringar i biologiska markörer (se hänvisning 3, 4). Noggrant övervägande av fördelar och nackdelar bör göras före starten av direktdoseringsstudier av diande ungar (se hänvisning 5).

Doseringsschema och administrering av doser

26. Viss information om brunstcykler, histopatologi i hanliga och honliga reproduktionsorgan och testikel-/epididymala spermieanalyser kan finnas tillgängliga från tidigare toxicitetsstudier av upprepade doser med tillräcklig varaktighet. Behandlingstiden före parning i den utökade engenerationsstudien av reproduktionstoxicitet är därför inriktad på att upptäcka effekter på funktionella förändringar som kan störa parningsbeteendet och fruktsamheten. Behandlingen före parning bör pågå tillräckligt länge för att uppnå ett stabilt tillstånd vad gäller exponeringsförhållandena hos P-hanar och -honor. En 2-veckorsbehandling före parningen för båda könen anses vara tillräcklig i de flesta fall. För honor täcker detta 3–4 kompletta brunstcykler, vilket bör vara tillräckligt för att upptäcka eventuella negativa effekter på cykliciteten. För hanar motsvarar detta den tid som krävs för epididymal transitering av mognande spermier och bör göra det möjligt att upptäcka eftertestikeleffekter på spermier (under slutskedet av spermiation och epididymal spermiemognad) vid parningen. Vid tidpunkten för avslutningen, då testikel- och epididymalhistopatologi och analys av spermieparametrar är planerade, ska P- och F_1-hanarna ha utsatts för minst en hel spermatogenesprocess (se hänvisning 6, 7, 8, 9 och OECD:s vägledning 151 [hänvisning 40]).

▼M5

27. Exponeringsscenarier före parningen för hanar ska kunna anpassas, om testikeltoxicitet (nedsatt spermiebildning) eller effekter på spermieintegritet och -funktion tydligt har identifierats i tidigare studier. På samma sätt kan kända effekter av testkemikalien i brunstcykeln, och därmed sexuell mottaglighet hos honor, motivera olika exponeringsscenarier före parningen. I speciella fall kan det vara acceptabelt att behandling av P-honor initieras först efter att spermiepositiva utstryk har erhållits (se OECD:s vägledning 151 [hänvisning 40]).

28. När väl doseringsperioden före parningen är etablerad, bör djuren behandlas med testkemikalien kontinuerligt 7 dagar per vecka fram till obduktionen. Samtliga djur ska doseras med samma metod. Doseringen bör fortsätta under den 2 veckor långa parningsperioden, och för P-honor genom hela dräktigheten och laktationen fram till avslutningsdagen efter avvänjningen. Hanar bör behandlas på samma sätt fram till avslutningen, vid tidpunkten för F_1-djurens avvänjning. För obduktion bör honor prioriteras, och de bör obduceras på samma eller nästan samma laktationsdag. Obduktionen av hanar kan spridas över ett större antal dagar beroende på laboratorieanläggning. Om direktdosering inte redan har inletts under laktationsperioden, bör direktdosering av de utvalda F_1-hanarna och -honorna börja vid avvänjningen och fortsätta fram till den planerade obduktionen, beroende på kohortanvisning.

29. För kemikalier som tillförs via fodret eller dricksvattnet är det viktigt att säkerställa att kvantiteterna av den berörda testkemikalien inte påverkar normal närings- eller vattenbalans. När testkemikalien tillförs via födan kan antingen en konstant koncentration (ppm) eller en konstant dosnivå i förhållande till djurens kroppsvikt användas. Det valda alternativet bör anges.

30. När testkemikalien tillförs genom sondmatning bör den vätskevolym som tillförs på en gång normalt inte överstiga 1 ml per 100 g kroppsvikt (0,4 ml per 100 g kroppsvikt är det maximala för olja, t.ex.majsolja). Med undantag för irriterande eller frätande kemikalier, som normalt ger starkare effekter vid högre koncentrationer, bör variationer av testvolymen minimeras genom justering av koncentrationen för att säkerställa en konstant volym vid alla dosnivåer. Behandlingen bör ges vid samma tid varje dag. Dosen till varje djur ska normalt baseras på den senast fastställda individuella kroppsvikten och bör justeras minst en gång i veckan för vuxna hanar och vuxna icke-dräktiga honor och varannan dag för dräktiga honor och F_1-djur, när de administreras före avvänjningen och under 2 veckor efter avvänjningen. Om TK-data indikerar en låg placentaöverföring av testkemikalien, måste kanske sondmatningsdosen under den sista veckan av dräktigheten justeras för att undvika tillförsel av en alltför toxisk dos till moderdjuret. Honor bör inte behandlas genom sondmatning eller någon annan behandlingsväg där djuret måste hanteras på dagen för nedkomsten, och att avstå från att administrera testkemikalien den dagen är att föredra framför att störa förlossningsprocessen.

▼M5

Parning

31. Varje P-hona ska placeras med en enda, slumpmässigt utvald, obesläktad hane från samma dosgrupp (1:1-parning) tills tecken på kopulation observeras eller 2 veckor har gått. Om det inte finns tillräckligt med hanar, till exempel på grund av dödsfall hos hanarna före hopparning, då kan hanar som redan har parat sig paras ihop (1:1) med en andra hona, så att alla honor blir hopparade. Dag 0 av dräktigheten definieras som den dag då bevis på parning bekräftas (vaginalplugg eller sperma observeras). Djuren bör skiljas åt så snart som möjligt efter att tecken på parning har observerats. Om parning inte har inträffat efter 2 veckor, bör djuren separeras utan ytterligare möjlighet till parning. De par som har parat sig bör tydligt identifieras i data.

Kullstorlek

32. På dag 4 efter födseln kan storleken på varje kull justeras genom att extra ungar elimineras genom slumpmässigt urval så att varje kull i möjligaste mån innehåller fem hanar och fem honor. Selektiv eliminering av ungar,t.ex.baserat på kroppsvikt är inte lämpligt. När antalet han- eller honungar inte medger fem av varje kön per kull, är partiell anpassning acceptabelt (t.ex. sex hanar och fyra honor).

Urval av ungar till studier efter avvänjningen (se figur 1)

33. Vid avvänjningen (omkring PND 21) väljs ungar ut från alla tillgängliga kullar upp till 20 per dos- och kontrollgrupp för ytterligare undersökningar och bibehålls fram till den sexuella mognaden (om inte tidigare testning krävs). Ungarna väljs ut slumpmässigt, med undantag av uppenbart småväxta djur (djur med en kroppsvikt som ligger mer än två standardavvikelser under medelvikten för respektive kull) som inte bör ingå, eftersom de sannolikt inte är representativa för behandlingsgruppen.

På PND 21 fördelas de valda F_1 -ungarna slumpvis till en av tre kohorter av djur, enligt följande:

Kohort 1 (1A och 1B) = testning av reproduktions-/utvecklingstoxicitet.

Kohort 2 (2A och 2B) = testning av utvecklingsneurotoxicitet.

Kohort 3 = testning av utvecklingsimmunotoxicitet.

Kohort 1A: En hane och en hona/kull/grupp (20/kön/grupp): prioriterat val för primär bedömning av effekter på reproduktionssystem samt av allmän toxicitet.

Kohort 1B: En hane och en hona/kull/grupp (20/kön/grupp): prioriterat val för uppföljande utvärdering av fortplantningsförmågan genom att para F1-djur vid bedömningen (se OECD:s vägledning 117 [hänvisning 39]), och för att erhålla ytterligare histopatologiska data vid misstanke om reproduktivt eller endokrint toxiska ämnen, eller när resultaten från kohort 1A är tvetydiga.

Kohort 2A: Totalt 20 ungar per grupp (10 hanar och 10 honor per grupp, en hane eller en hona per kull) anvisas till neurobeetendemässig testning, följt av neurohistopatologisk bedömning som vuxna.

Kohort 2B: Totalt 20 ungar per grupp (10 hanar och 10 honor per grupp, en hane eller en hona per kull) anvisas till neurohistopatologisk bedömning vid avvänjningen (PND 21 eller PND 22). Om det inte finns ett tillräckligt antal djur, bör man i första hand anvisa djur till kohort 2A.

▼M5

Kohort 3: Totalt 20 ungar per grupp (10 hanar och 10 honor per grupp, en per kull, där så är möjligt). Ytterligare ungar kan krävas från kontrollgruppen för att fungera som positiva kontrolldjur i det T-cellsberoende antikroppsresponstestet (TDAR) vid PND 56 ± 3.

34. Om antalet ungar i en kull är tillräckligt för att fylla alla kohorter, har kohort 1 företräde eftersom den kan utvidgas till att producera en F_2-generation. Ytterligare ungar kan tilldelas till någon av kohorterna om det finns särskild anledning, t.ex.om man misstänker en kemikalie för att vara neurotoxisk, immunotoxisk eller reproduktionstoxisk. Dessa ungar kan användas för undersökningar vid olika tidpunkter eller för utvärdering av kompletterande endpoints. Ungar som inte har anvisats till kohorter ska genomgå klinisk biokemi (punkt 55) och obduktion (punkt 68).

Andra parningen av P-djuren

35. En andra parning rekommenderas normalt inte för P-djuren, eftersom det innebär förlust av viktig information om antal implantationsställen (och därmed data om efterimplantation och perinatal dödlighet, indikatorer på en möjlig teratogen potential) i den första kullen. Behovet av att verifiera eller belysa en effekt på exponerade honor kan förbättras genom att undersökningen utvidgas till att omfatta en parning av F_1-generationen. Men en andra parning av P-hanar med obehandlade honor är alltid ett alternativ för att klargöra osäkra slutsatser, eller för att ytterligare karakterisera effekter på fertiliteten som observerats i den första parningen.

OBSERVATIONER AV LEVANDE DJUR

Kliniska observationer

36. För P- och utvalda F_1-djur görs en allmän klinisk observation en gång per dag. Vid sondmatningsdosering, bör tidpunkten för de kliniska observationerna vara före och efter doseringen (för eventuella tecken på toxicitet i samband med maximal plasmakoncentration). Relevanta beteendeförändringar, tecken på svår eller utdragen förlossning och alla tecken på toxicitet registreras. Två gånger dagligen, under helgen en gång dagligen, observeras samtliga djur avseende allvarlig toxicitet, sjuklighet och dödlighet.

37. Dessutom görs en mer ingående granskning av alla P- och F_1-djur (efter avvänjning) en gång i veckan, och kan då lämpligen utföras då djuret vägs för att minimera hanteringsstressen. Observationerna bör genomföras och registreras noggrant med hjälp av bedömningssystem som har fastställts av testlaboratoriet. Ansträngningar bör göras för att säkerställa att variationerna i testbetingelserna är minimala. Observationerna bör omfatta, men inte begränsas till, förändringar i hud, päls, ögon, slemhinnor, förekomst av sekret och utsöndringar samt autonom aktivitet (t.ex. tårflöde, piloerektion, pupillstorlek, ovanligt andningsmönster). Förändringar i gång, hållning, reaktion på hantering liksom förekomst av kloniska eller toniska rörelser, stereotypi (t.ex. överdrivet putsande, repetitivt cirklande) eller bisarrt beteende (t.ex. självstympning, baklängesgång) ska också registreras.

▼M5

Kroppsvikt och foder-/vattenkonsumtion

38. P-djuren vägs på den första doseringsdagen och därefter minst en gång per vecka. Dessutom vägs P-honorna under laktationen på samma dagar som vägningen av ungarna i deras kullar (se punkt 44). Alla F_1-djur vägs individuellt vid avvänjningen (PND 21) och därefter minst en gång per vecka. Kroppsvikten registreras också på den dag då de når puberteten (avslutad preputial separation eller vaginal öppning). Alla djur vägs vid avlivningen.

39. Under studien registreras foder- och vattenkonsumtionen (om testkemikalien administreras via dricksvatten) minst en gång i veckan på samma dagar som för djurens kroppsvikt (förutom under saminhysningen). Foderkonsumtion för varje bur med F_1-djur redovisas varje vecka med början vid urvalet till respektive kohort.

Brunstcykler

40. Preliminär information om testkemikalierelaterade effekter på brunstcykeln kan redan finnas tillgängliga genom tidigare toxicitetsstudier med upprepad dosering, och kan användas i utformningen av ett testkemikaliespecifikt protokoll för den utökade engenerationsstudien av reproduktionstoxicitet. Normalt startar bedömningen av brunstcykeln (vaginal cytologi) i början av behandlingsperioden och fortsätter tills bekräftelse på parning, eller i slutet av parningsperioden om 2 veckor. Om honorna har screenats för normala brunstcykler före behandlingen är det bra att fortsätta med utstryk när behandlingen påbörjas, men om det finns misstankar om ickespecifika effekter i början av behandlingen (till exempel en initial markant minskning av foderkonsumtion) kan djuren tillåtas att anpassa sig till behandlingen i upp till två veckor innan den två veckor långa utstrycksperioden före hopparning inleds. Om honans behandlingsperiod förlängs på detta sätt (dvs.till en 4-veckors behandling före parning) bör man överväga att köpa in yngre djur samt att förlänga hanens behandling före hopparning. När vaginala/cervikala celler erhålls, bör försiktighet iakttas för att undvika skador på slemhinnan och följaktligen framkallande av skendräktighet (se hänvisning 10, 11).

41. Vaginala utstryk bör undersökas dagligen för alla F_1-honor i kohort 1A, efter vaginal öppning tills det första förhornade utstryket registreras, för att bestämma tidsintervallet mellan dessa två händelser. Brunstcykler för alla F_1-honor i kohort 1A bör också övervakas under två veckor, med början runt PND 75. Om parning av F_1-generationen blir nödvändig, kommer den vaginala cytologin i kohort 1B följas från tidpunkten för hopparning tills bevis på parning upptäcks.

Parning och dräktighet

42. Utöver standardendpoints (t.ex.kroppsvikt, foderkonsumtion, kliniska iakttagelser, inklusive kontroller av dödlighet/sjuklighet), registreras datum för hopparning, datum för insemination och tidpunkt för förlossning och precoitalt intervall (hopparning till insemination) och dräktighetstid (insemination till förlossning) beräknas. P-honorna bör undersökas noggrant i samband med förväntad nedkomst efter tecken på dystoki. Eventuella avvikelser i bobyggnad eller omvårdnad ska registreras.

▼M5

43. Den dag då förlossning sker är laktationsdag 0 (LD 0) för moderdjuret och postnatal dag 0 (PND 0) för avkomman. Alternativt kan alla jämförelser också baseras på postkoital tid för att eliminera störning av postnatala utvecklingsdata genom skillnader i dräktighetstid, dock ska tidpunkten i förhållande till nedkomsten också registreras. Detta är särskilt viktigt när testkemikalien påverkar dräktighetstiden.

Parametrar för avkomman

44. Varje kull bör undersökas så snart som möjligt efter nedkomsten (PND 0 eller 1) för att fastställa ungarnas antal och kön, dödfödda, levande födda samt närvaron av grova anomalier (utvändigt synliga missbildningar, inklusive gomspalt, subkutana blödningar, onormal hudfärg eller -struktur, förekomst av navelsträng, brist på mjölk i magen, förekomst av torkat sekret). Vidare bör den första kliniska undersökningen av nyfödda omfatta en kvalitativ bedömning av kroppstemperatur, aktivitetstillstånd och reaktion på hantering. Ungar som påträffas döda på PND 0 bör undersökas, eller vid ett senare tillfälle undersökas avseende eventuella defekter och dödsorsak. Levande ungar räknas och vägs individuellt på PND 0 eller PND 1, och därefter regelbundet, t.ex.åtminstone PND 4, 7, 14 och 21. Kliniska undersökningar som är lämpliga för djurens ålder bör upprepas när avkomman vägs, eller oftare om fallspecifika fynd har gjorts vid födseln. Tecken som noteras kan omfatta, men inte begränsas till, yttre missbildningar, förändringar i hud, päls, ögon, slemhinnor, förekomst av sekret och utsöndringar samt autonom aktivitet. Förändringar i gång, hållning, reaktion på hantering liksom förekomst av kloniska eller toniska rörelser, stereotypi eller bisarrt beteende ska också registreras.

45. Det anogenitala avståndet (AGD) hos varje unge bör mätas åtminstone vid ett tillfälle från PND 0 till PND 4. Ungarnas kroppsvikt bör samlas in under dagen för AGD-mätningen och AGD bör normaliseras till ett mått på ungarnas storlek, företrädesvis kubikroten ur kroppsvikten (se hänvisning 12). Förekomsten av bröstvårtor/vårtgård bör kontrolleras på hanungarna PND 12 eller 13.

46. För att upptäcka om könsmognad inträffar tidigt utvärderas alla utvalda F_1-djur dagligen avseende om balano-preputial separation eller vaginal öppning för hanar respektive honor inleds före den beräknade dagen för dessa endpoints. Eventuella missbildningar i könsorganen, såsom långlivad vaginal tråd, hypospadi eller kluven penis, bör noteras. Könsmognad hos F_1-djur jämförs med fysisk utveckling genom bestämning av ålder och kroppsvikt vid balano-preputial separation eller vaginal öppning för hanar/honor var för sig (se hänvisning 13).

Bedömning av potentiell utvecklingsneurotoxicitet (kohorter 2A och 2B)

47. 10 hanar och 10 honor i kohort 2A och 10 hanar och 10 honor i kohort 2B från varje behandlingsgrupp (för varje kohort: 1 hane eller 1 hona per kull; alla kullar representeras av minst 1 unge; slumpmässigt urval) ska användas för bedömning av neurotoxicitet. Kohort 2A-djur genomgår ett test med plötsliga ljud, ett testbatteri för funktionsobservation samt bedömningar av motorisk aktivitet (se punkterna 48–50) och neuropatologi (se punkterna 74–75). Ansträngningar bör göras för att säkerställa att

▼M5

variationerna för samtliga testbetingelser är minimala och inte systematiskt relaterade till behandlingen. Bland de variabler som kan påverka beteendet är ljudnivån (t.ex. intermittent buller), temperatur, luftfuktighet, ljus, lukter, tid på dygnet och miljömässiga distraktioner. Resultaten från neurotoxicitetstesterna ska tolkas i förhållande till lämpliga historiska kontrollreferensintervall. Kohort 2B-djur bör användas för neuropatologisk bedömning på PND 21 eller PND 22 (se punkterna 74–75).

48. Ett test med plötsliga ljud ska utföras på PND 24 (± 1 dag) med djur i kohort 2A. Dagen för testningen bör balanseras över behandlings- och kontrollgrupperna. Varje session består av 50 försök. Vid utförandet av test med plötsliga ljud, bör den genomsnittliga reaktionsamplituden på varje block med 10 försök (5 block med 10 försök) bestämmas, med optimerade testförhållanden för att ge tillvänjning inom sessionen. Dessa förfaranden bör vara förenliga med testmetod B.53 (se hänvisning 35).

49. Vid en lämplig tidpunkt mellan PND 63 och PND 75 genomgår kohort 2A-djuren ett testbatteri för funktionsobservation samt ett automatiserat test av motorisk aktivitet. Dessa förfaranden bör vara förenliga med testmetoderna B.43 (se hänvisning 33) och B.53 (se hänvisning 35). Testbatteriet för funktionsobservation innehåller en noggrann beskrivning av djurets utseende, beteende samt funktionella integritet. Detta bedöms genom observationer i buren, efter avlägsnande av en standardarena för observation (öppet fält) där djuret rör sig fritt och genom manipulativa tester. Testning bör utföras från den minst till den mest interaktiva. En lista med mått finns i tillägg 1. Alla djur bör observeras noga av utbildade observatörer som är omedvetna om djurens behandlingsstatus, med hjälp av standardiserade procedurer för att minimera variabiliteten mellan observatörer. Om möjligt är det lämpligt att samma observatör utvärderar djuren för ett givet test. Om detta inte är möjligt, krävs något bevis på tillförlitlighet mellan de olika observatörerna. För varje parameter i det beteendevetenskapliga testbatteriet ska explicita operativa definierade skalor och bedömningskriterier användas. Om möjligt bör objektiva kvantitativa mått utvecklas för observationsendpoints som innebär subjektiv rangordning. Varje djur testas individuellt med avseende på motorisk aktivitet. Testperioden bör vara tillräckligt lång för att visa tillvänjning inom kontrollperioden. Motorisk aktivitet bör övervakas av en automatisk apparat för aktivitetsregistrering som bör kunna upptäcka både ökad och minskad aktivitet, (dvs. det referensvärde för aktivitet som mäts av apparaten bör inte vara så lågt att en upptäckt av minskning förhindras och inte heller så högt att en upptäckt av ökning förhindras). Varje enhet bör testas genom standardförfaranden, för att så långt som möjligt säkerställa tillförlitlighet i driften mellan olika apparater och mellan olika dagar. I den mån det är möjligt bör behandlingsgrupperna balanseras mellan enheterna. Behandlingsgrupperna bör fördelas jämnt över testtiderna för att undvika störning av dygnsrytmer.

50. Om befintlig information visar att det behövs andra typer av funktionstestning (t.ex. sensorisk, social, kognitiv) bör dessa integreras utan att äventyra integriteten för övriga utvärderingar som gjorts i studien. Om denna testning utförs på samma djur som använts för standardtest med plötsliga ljud, testbatteri för funktionsobservation och test av motorisk aktivitet, bör olika tester planeras för att minimera risken av att äventyra integriteten för dessa tester. Kompletterande förfaranden kan vara särskilt användbara när empirisk observation, förväntade effekter eller mekanismer/tillvägagångssätt indikerar en viss typ av neurotoxicitet.

▼M5

Bedömning av potentiell utvecklingsimmunotoxicitet (kohort 3)

51. På PND 56 (± 3 dagar) ska 10 hanar och 10 honor i kohort 3 från varje behandlingsgrupp (1 hane eller 1 hona per kull, alla kullar representerade av minst 1 unge, slumpmässigt utvald) användas i ett test av T-cellsberoende antikroppsresponser,dvs. den primära IgM-antikroppsresponsen på en T-cellsberoende antigen, såsom röda blodkroppar från får (*Sheep Red Blood Cells*, SRBC) eller hemocyanin från nyckelhålssnäckor (*Keyhole Limpet Hemocyanin*, KLH), i överensstämmelse med nuvarande immunanalysförfaranden (se hänvisning 14, 15). Responsen kan utvärderas genom att räkna särskilda plackbildande celler (PFC) i mjälten eller genom att bestämma titer av SRBC- eller KLH-specifika IgM-antikroppar i serum med Elisa, vid maximal respons. Maximala responser inträffar vanligtvis fyra (PFC-respons) eller fem (Elisa) dagar efter intravenös immunisering. Om den primära antikroppsresponsen analyseras genom räkning av plackbildande celler, är det tillåtet att utvärdera undergrupper av djur på olika dagar, förutsatt att undergruppsimmunisering och -avlivning är tidsinställda så att PFC räknas vid den maximala responsen, att undergrupperna innehåller lika många hanliga som honliga avkommor från alla dosgrupper, inklusive kontroller, samt att undergrupperna utvärderas vid ungefär samma postnatala ålder.Exponering för testkemikalien ska fortsätta fram till dagen innan insamlingen av mjältar för PFC-respons, eller serum för Elisa-test.

Uppföljande utvärdering av potentiell reproduktionstoxicitet (kohort 1B)

52. Kohort 1B-djur kan hållas på behandling efter PND 90 och avlas för att få fram en F_2-generation, om det behövs. Hanar och honor i samma dosgrupp bör saminhysas (undvik att para ihop syskon) i upp till två veckor, med början på PND 90 eller senare, men senast PND 120. Förfarandena bör vara desamma som för P-djuren. Baserat på en sammanvägd bedömning kan det räcka med att avliva kullarna på PND 4, i stället för att följa dem fram till avvänjningen eller längre.

TERMINALA OBSERVATIONER

Klinisk biokemi/hematologi

53. Systemiska effekter bör övervakas hos P-djur. Blodprov från en definierad plats tas från tio slumpmässigt utvalda fastande P-hanar och -honor per dosgrupp vid avslutningen. De ska förvaras under lämpliga förhållanden och utsättas för partiell eller fullskalig hematologi, klinisk biokemi, test av T4 och TSH eller andra undersökningar som föranleds av testkemikaliens kända biverkningsprofil (se OECD:s vägledning 151 [hänvisning 40]). Följande hematologiska parametrar bör undersökas: hematokrit, hemoglobinkoncentration, erytrocytantal, totalt och differentierat leukocytantal, trombocytantal och blodkoagulationstid/-potential. Undersökningar av serum eller plasma bör omfatta glukos, totalkolesterol, urinämne, kreatinin, totalprotein och albumin, minst två enzymer som indikerar verkningar på leverceller (t.ex. alaninaminotransferas, aspartataminotransferas, alkaliskt fosfatas, gamma-glutamyltranspeptidas och sorbitoldehydrogenas). Mätningar av ytterligare enzymer och gallsyror kan under vissa förhållanden ge användbar information. Dessutom kan man lagra blodet från samtliga

▼M5

djur för eventuell analys vid ett senare tillfälle för att klargöra tvetydiga effekter eller för att generera intern exponeringsdata. Om en andra parning av P-djur inte planeras ska blodprover tas strax innan, eller som en del av, förfarandet vid den planerade avlivningen. I de fall då djuren behålls bör blodprov samlas in några dagar innan djuren paras för andra gången. Om inte befintliga data från studier med upprepad dosering tyder på att parametern inte påverkas av testkemikalien, bör urinanalys genomföras före avslutningen och följande parametrar utvärderas: utseende, volym, osmolalitet eller specifik vikt, pH-värde, protein, glukos, blod och blodkroppar samt cellrester. Urin kan också samlas in för att övervaka utsöndring av testkemikalien och/eller metaboliter.

54. Systemiska effekter bör också övervakas hos F_1-djur. Blodprov från en definierad plats tas från tio slumpvis utvalda fastande kohort 1A-hanar och -honor per dosgrupp vid avslutningen. De ska förvaras under lämpliga förhållanden och utsättas för vanlig klinisk biokemi, inklusive bedömning av serumnivåer för sköldkörtelhormon (T4 och TSH), bedömning av hematologi (totalt och differentierat leukocytantal samt erytrocytantal) och urinanalys.

55. På PND 4 obduceras överskottsungarna och man bör överväga mätning av koncentrationen av serumsköldkörtelhormon (T4). Vid behov kan neonatalt (PND 4) blod slås samman per kull för biokemiska analys och sköldkörtelhormonanalys. Blod samlas också in för T4- och TSH-analyser från avvanda djur som obduceras på PND 22 (F_1-ungar som inte valts ut till kohorter).

Spermieparametrar

56. Spermieparametrar bör mätas i alla P-generationshanar om det inte finns befintliga data som visar att spermieparametrar är opåverkade i en 90-dagarsstudie. Undersökning av spermieparametrar bör utföras på alla kohort 1A-hanar.

57. Vid avslutningen registreras testikel- och bitestikelvikter för alla P- och F_1-hanar (kohort 1A). Minst en testikel och en bitestikel reserveras för en histopatologisk undersökning. Den återstående bitestikeln används för kvantifiering av spermiereserver från cauda epididymis (se hänvisning 16, 17). Dessutom samlas spermier från cauda epididymis (eller sädesledare) in med hjälp av metoder som minimerar skador för utvärdering av spermiemotilitet och -morfologi (se hänvisning 18).

58. Spermiemotilitet kan antingen utvärderas omedelbart efter avlivningen eller registreras för senare analys. Den procentuella andelen av progressivt rörliga spermier kan antingen bestämmas subjektivt eller objektivt genom datorstödd rörelseanalys (se hänvisning 19, 20, 21, 22, 23, 24). För utvärderingen av spermiemorfologi bör ett spermieprov från bitestikel (eller sädesledare) undersökas som fast eller vått preparat (se hänvisning 25), och minst 200 spermier per prov ska antingen klassificeras som normala (både huvud och mellanstycke/svans verkar vara normala) eller onormala. Exempel på morfologiska spermieavvikelser kan innefatta fusion, avskilda huvuden och defekta huvuden och/eller svansar (se hänvisning 26). Defekta eller stora spermiehuvuden kan tyda på brister i spermiation.

59. Om spermieprover fryses, registreras analysen av fixerade utstryksprov och bilder av spermierörlighet vid tidpunkten för obduktionen (se hänvisning 27), efterföljande analys kan begränsas till kontroll- och högdoshanar. Om behandlingsrelaterade effekter observeras så bör också de lägre dosgrupperna utvärderas.

▼M5

Obduktion

60. Vid tidpunkten för avslutning eller förtida död obduceras P- och F_1-djuren och undersöks makroskopiskt avseende eventuella strukturella abnormiteter eller patologiska förändringar. Särskild uppmärksamhet bör ägnas åt organen i reproduktionssystemet. Ungar som avlivas humant i döende tillstånd och döda ungar ska registreras och, när de inte är utmärglade, undersökas avseende eventuella defekter och/eller dödsorsak samt bevaras.

61. På vuxna P- och F_1-honor undersöks vaginala utstryk på dagen för obduktionen, för att fastställa brunstcykelns skede och möjliggöra korrelation med histopatologi i fortplantningsorganen. Livmodern hos alla P-honor (och F_1-honor, om tillämpligt) undersöks avseende förekomst och antal implantationsställen på ett sätt som inte stör den histopatologiska utvärderingen.

Organvikt och vävnadskonservering – vuxna P- och F_1-djur

62. Vid tidpunkten för avslutningen fastställs kroppsvikterna och organens våtvikter som anges nedan från alla P-djur och alla F_1-vuxna från relevanta kohorter (som beskrivs nedan), så snart som möjligt efter dissekeringen för att undvika uttorkning. Dessa organ bör därefter bevaras under lämpliga förhållanden. Om inte annat anges kan pariga organ vägas individuellt eller i kombination, i enlighet med det typiska utförandet för det berörda laboratoriet.

— Livmoder (med äggledare och livmoderhals), äggstockar

— Testiklar, bitestiklar (hela och cauda för de prover som används för spermieräkning)

— Prostata (dorsolaterala och ventrala delar kombinerade). Försiktighet bör iakttas vid putsning av prostatakomplexet för att undvika punktion av de vätskefyllda blåsorna. I händelse av en behandlingsrelaterad effekt på total prostatavikt bör de dorsolaterala och ventrala segmenten noggrant dissekeras efter fixering och vägas separat.

— Sädesblåsor med koagulerande körtlar och deras vätskor (som en enhet).

— Hjärna, lever, njurar, hjärta, mjälte, tymus, hypofys, sköldkörtel (efter fixering), binjurarna och kända målorgan eller vävnader.

63. Förutom de organ som anges ovan, bör prover av perifer nerv, muskel, ryggmärg, öga med synnerv, mag-tarmkanalen, urinblåsa, lunga, luftstrupe (med vidhängande sköldkörtel och bisköldkörtel), benmärg, sädesledaren (hanar), bröstkörtel (hanar och honor) och vagina bevaras under lämpliga förhållanden.

64. För kohort 1A-djur vägs alla organ och bevaras för histopatologi.

65. För utredning av pre- och postnatalt inducerade immunotoxiska effekter ska 10 hanar och 10 honor i kohort 1A från varje behandlingsgrupp (1 hane eller 1 hona per kull, alla kullar representerade av minst 1 unge, slumpmässigt utvald) genomgå följande vid avslutningen:

— Vägning av lymfkörtlarna förknippade med och långt ifrån exponeringsvägen (förutom vikten på binjurar, tymus och mjälte, som redan utförts för alla kohort 1A-djur).

▼M5

— Analys av mjältlymfocytpopulationer (CD4+ och CD8+ T-lymfocyter, B-lymfocyter och naturliga mördarceller) genom att använda halva mjälten, varvid den andra hälften av mjälten bevaras för histopatologisk utvärdering,

Analys av mjältlymfocytsubpopulationer i icke-immuniserade (kohort 1A) djur kommer att avgöra om exponeringen är relaterad till en förändring i den immunologiska steady state-distribution av hjälparceller (CD4+) eller cytotoxiska (CD8+) tymus-härledda lymfocyter eller naturliga mördarceller (snabb respons på neoplastiska celler och patogener).

66. Kohort 1B-djur bör få följande organ vägda och motsvarande vävnader bearbetade till blockstadiet:

— Vagina (ej vägd).

— Livmoder med livmoderhals.

— Äggstockar.

— Testiklar (minst en).

— Bitestiklar.

— Sädesblåsor och koagulerande körtlar.

— Prostata.

— Hypofys.

— Identifierade målorgan.

Histopatologi i kohort 1B ska genomföras om resultaten från kohort 1A är tvetydiga eller vid misstanke om reproduktions- eller endokrintoxiska ämnen.

67. Kohort 2A och 2B: Testning av utvecklingsneurotoxicitet (PND 21 eller PND 22 och vuxen avkomma). Kohort 2A-djur avlivas efter beteendetestning med registrering av hjärnvikter och en komplett neurohistopatologi i syfte att bedöma neurotoxicitet. Kohort 2B-djur avlivas på PND 21 eller PND 22 med registrering av hjärnvikter samt en mikroskopisk undersökning av hjärnan i syfte att bedöma neurotoxicitet. Perfusionsfixering krävs för kohort 2A-djur och finns som tillval för kohort 2B-djur, i enlighet med testmetod B.53 (se hänvisning 35).

Organvikt och vävnadskonservering – avvanda F_1-djur

68. Ungar som inte valts ut till kohorter, inklusive småväxta djur, avlivas efter avvänjningen på PND 22, om inte resultaten visar ett behov av ytterligare undersökningar i levande djur. Avlivade ungar obduceras vilket inkluderar en bedömning av reproduktionsorganen, såsom beskrivs i punkterna 62 och 63. På upp till 10 ungar per kön per grupp, från så många kullar som möjligt, bör hjärna, mjälte och tymus vägas och bevaras under lämpliga förhållanden. Dessutom kan bröstvävnaderna från dessa han- och honungar bevaras för ytterligare mikroskopisk analys ([1]) (se OECD:s vägledning 151 [hänvisning 40]). Alla större avvikelser och målvävnader bör sparas för eventuell histologisk undersökning.

([1]) Forskning har visat att bröstkörteln, framför allt i bröstkörtelns tidiga utveckling, är en känslig endpoint för östrogen verkan. Det rekommenderas att endpoints som involverar ungarnas mjölkkörtlar hos båda könen bör ingå i denna testmetod, när den har validerats.

▼M5

Histopatologi – P-djur

69. En fullständig histopatologisk undersökning av de organ som anges i punkterna 62 och 63 genomförs för alla högdos- och P-kontrolldjur. Organ som visar behandlingsrelaterade förändringar bör också undersökas hos alla djur i de lägre dosgrupperna för att hjälpa till att fastställa ett Noael-värde. Dessutom bör reproduktionsorganen hos alla djur som misstänks ha minskad fertilitet, t.ex. de som misslyckats med att para sig, bli dräktiga, befrukta eller leverera frisk avkomma, eller för vilka brunstcykeln eller spermieantalet, rörligheten eller morfologin påverkats, samt alla större skador utvärderas histopatologiskt.

Histopatologi – F_1-djur

Kohort 1-djur

70. En fullständig histopatologisk undersökning av de organ som anges i punkterna 62 och 63 genomförs för alla högdos- och vuxna kohort 1A-kontrolldjur. Alla kullar bör representeras av minst 1 unge per kön. Organ och vävnader som visar behandlingsrelaterade förändringar samt alla större skador bör också undersökas hos alla djur i de lägre dosgrupperna som hjälp för att fastställa ett Noael-värde. För utvärdering av pre- och postnatalt inducerade effekter på lymfoida organ bör också histopatologin på de insamlade lymfkörtlarna och benmärgen utvärderas hos 10 hanar och 10 honor i kohort 1A vid sidan av en histopatologisk utvärdering av bräss, mjälte, och binjurar som redan har utförts för alla 1A-djur.

71. Reproduktiva och endokrina vävnader från alla kohort 1B-djur bearbetade till blockstadiet som beskrivs i punkt 66, bör undersökas beträffande histopatologi vid misstanke om reproduktions- eller endokrintoxiska ämnen. Även kohort 1B bör genomgå histologisk undersökning, om resultaten från kohort 1A är tvetydiga.

72. Äggstockarna hos vuxna honor bör innehålla primordiala och växande folliklar samt gulkroppar, och därför bör en histopatologisk undersökning syfta till att göra en kvantitativ utvärdering av primordiala och små växande folliklar, liksom gulkroppar, hos F_1-honor. Antalet djur, äggstocksснittsval och snittprovstorlek ska vara statistiskt lämpliga för det utvärderingsförfarande som används. Follikelräkning kan först utföras på kontroll- och högdosdjur och i händelse av en negativ effekt på de senare bör lägre doser undersökas. Undersökningen bör innefatta räkning av antalet primordiala folliklar, vilken kan kombineras med små växande folliklar, för jämförelse av äggstockar från behandling och kontroll (se OECD:s vägledning 151 [hänvisning 40]). Gulkroppsbedömningen bör ske parallellt med brunstcykeltestningen så att cykelns stadium kan tas i beaktande vid bedömningen. Äggledare, livmoder och vagina undersöks för lämplig organtypisk utveckling.

73. Detaljerade testikelhistopatologiska undersökningar genomförs på F_1-hanar för att identifiera behandlingsrelaterade effekter på testiklarnas differentiering och utveckling samt på spermatogenesen (se hänvisning 38). Om möjligt bör delar av rete testis undersökas. Bitestiklarnas caput, corpus och cauda samt sädesledaren undersöks för lämplig organtypisk utveckling, liksom de parametrar som krävs för P-hanarna.

▼M5

Kohort 2-djur

74. Neurohistopatologi utförs för alla högdos- och kontrollkohort 2A-djur av varje kön efter avslutad neurobeteendetestning (efter PND 75, men inte efter PND 90). Hjärnhistopatologi utförs för alla högdos- och kontrollkohort 2B-djur av varje kön på PND 21 eller PND 22. Organ som visar behandlingsrelaterade förändringar bör också undersökas hos alla djur i de lägre dosgrupperna som hjälp för att fastställa ett Noael-värde. För kohort 2A- och 2B-djur granskas flera avsnitt från hjärnan för att möjliggöra undersökning av luktbulberna, hjärnbarken, hippocampus, basala ganglierna, talamus, hypotalamus, mitthjärnan (thecum, tegmentum och hjärnstjälkarna), hjärnstammen och lillhjärnan. Enbart för kohort 2A undersöks ögon (näthinnan och synnerven) och prover från perifer nerv, muskel och ryggmärg. Alla neurohistologiska förfaranden bör vara förenliga med testmetod B.53 (se hänvisning 35).

75. Morfometriska (kvantitativa) utvärderingar bör utföras på representativa områden av hjärnan (homologa snitt väljs omsorgsfullt baserat på tillförlitliga mikroskopiska markörer) och kan inkludera linjära mätningar och/eller arealmätningar på specifika delar av hjärnan. Minst tre på varandra följande snitt bör tas vid varje markör (nivå) för att välja det mest homologa och representativa snittet för det specifika hjärnområde som ska utvärderas. Neuropatologen bör kunna bedöma om beredda snitt för mätning är homologa med andra i provuppsättningen, och därmed lämpar sig för integration, eftersom linjära mätningar i synnerhet kan förändras över en relativt kort sträcka (se hänvisning 28). Icke-homologa snitt bör inte användas. Även om målet är att ta prover från alla djur som är reserverade för detta ändamål (10/kön/dosnivå), kan ett mindre antal vara fullt tillräckligt. Dock anses prover från färre än 6 djur/kön/dosnivå generellt inte vara tillräckligt för tillämpning av denna testmetod. Stereologi kan användas för att identifiera behandlingsrelaterade effekter på parametrar såsom volym eller cellantal i specifika neuroanatomiska regioner. Under alla moment i prepareringen av vävnadsprover, från vävnadsfixering till dissektion av vävnadsprover, vävnadsbehandling och färgning av utstryksglas bör man använda sig av en balanserad utformning, så att varje sats innehåller representativa prover från varje dosgrupp. När morfometriska eller stereologiska analyser används bör hjärnvävnaden ingjutas i lämpligt medium samtidigt på alla dosnivåer för att undvika krympning av artefakter i samband med långvarig förvaring i fixativ.

RAPPORTERING

Data

76. Data rapporteras individuellt och sammanfattas i tabellform. I förekommande fall bör, för varje testgrupp och varje generation, följande rapporteras: antal djur i början av testet, antal djur som påträffats döda under testet eller som avlivats av humana skäl, tidpunkt för varje dödsfall eller avlivning, antal fertila djur, antal dräktiga honor, antal honor som föder en kull och antal djur som uppvisar tecken på toxicitet. En beskrivning av toxicitet, inklusive tidpunkt för första tecken, varaktighet och allvarlighetsgrad bör också rapporteras.

77. Numeriska resultat ska utvärderas genom en lämplig och accepterad statistisk metod. De statistiska metoderna bör väljas som en del av studieutformningen och bör på lämpligt sätt hantera icke-normala data (t.ex.beräkningsdata), censurerade data (t.ex.begränsad observationstid), icke-oberoende (t.ex. kulleffekter och upprepade mätningar) samt olika varianser. Generaliserade linjära blandade modeller och dos-responsmodeller täcker

▼M5

en bred klass av analytiska verktyg som kan vara lämpade för de data som genereras inom ramen för denna testmetod. Rapporten bör innehålla tillräckligt med information om analysmetoden och det datorprogram som används, så att en oberoende granskare/statistiker kan utvärdera/omvärdera analysen.

Utvärdering av resultaten

78. Resultaten bör utvärderas i termer av de observerade effekterna, inklusive obduktion och mikroskopiska iakttagelser. Utvärderingen omfattar sambandet, eller brist på samband, mellan dosen och förekomst, frekvens och svårighetsgrad för missbildningar, inklusive större skador. Målorgan, fertilitet, kliniska abnormiteter, reproduktions- och kullresultat, kroppsviktsförändringar, dödlighet och andra toxiska och utvecklingsmässiga effekter bör också bedömas. Särskild uppmärksamhet bör ägnas åt könsspecifika förändringar. Testkemikaliens fysikalisk-kemiska egenskaper och TK-data, när de är tillgängliga, inklusive överföring via placenta och mjölkutsöndring, bör beaktas vid utvärdering av testresultaten.

Testrapport

79. Testrapporten bör innehålla följande information som erhålls i den nu aktuella studien från P-, F_1- och F_2-djur (i tillämpliga fall):

Testkemikalie:

— All relevant och tillgänglig information om testkemikaliens kemiska, toxikokinetiska och toxikodynamiska egenskaper.

— Identifikationsuppgifter.

— Renhetsgrad.

Vehikel (i förekommande fall):

— Motivering för val av vehikel om annan än vatten.

Försöksdjur:

— Art och stam som används.

— Djurens antal, ålder och kön.

— Ursprung, inhysning, foder, bomaterial etc.

— Djurens individuella vikt vid testets början.

— Vaginalutstryksdata för P-honor innan behandlingen inleds (om uppgifterna samlas in vid den tidpunkten).

— Parningsregister för P-generationen som anger hanliga och honliga partner för en parning och parningens framgång.

— Uppgift om ursprungskull för vuxna F_1-generationsdjur.

Testbetingelser:

— Grund för val av dosnivå.

— Uppgifter om testkemikaliens sammansättning/foderberedning och uppnådda koncentrationer.

▼M5

— Beredningens stabilitet och homogenitet i vehikeln eller bäraren (t.ex.foder, dricksvatten) i blodet och/eller mjölken i enlighet med villkoren för användning och förvaring mellan användningarna.

— Uppgifter om administreringen av testkemikalien.

— Omvandling från fodrets/dricksvattnets testkemikaliekoncentration (ppm) till uppnådd dos (mg/kg kroppsvikt/dag), om tillämpligt.

— Uppgifter om foder- och vattenkvalitet (inbegripet fodersammansättning, om tillgängligt).

— Detaljerad beskrivning av randomiseringsförfaranden för att välja ungar för avlivning och för att anvisa ungar till testgrupper.

— Miljöförhållanden.

— Förteckning över personal som utför undersökningen, inklusive yrkesutbildning.

Resultat (sammanfattning och individuella data för respektive kön och dos):

— Foderkonsumtion, vattenförbrukning om tillgänglig, fodereffektivitet (kroppviktsökning per gram foder som konsumeras, med undantag av samhysningsperioden och under laktationen) samt testkemikalieförbrukning (för administration via foder/dricksvatten) för P- och F_1-djur.

— Absorptionsdata (om tillgängliga).

— Kroppviktsdata för P-djur.

— Kroppviktsdata för de valda F_1-djuren efter avvänjningen.

— Tidpunkt för dödsfall under testet eller huruvida djuren överlevde fram till avslutningen.

— Art, allvarlighetsgrad och varaktighet för kliniska observationer (huruvida de är reversibla eller ej).

— Hematologi, urinanalys och kliniska kemiska data inklusive TSH och T4.

— Fenotypisk analys av celler från mjälte (T-, B-, NK-celler).

— Benmärgens cellularitet.

— Uppgifter om toxiska reaktioner.

— Antal P- och F_1-honor med normal eller onormal brunstcykel samt cykelns varaktighet.

— Tid för parning (precoitalt intervall, antal dagar mellan hopparning och parning).

— Toxiska eller andra effekter på reproduktionen, inklusive antal och procentsatser för djur som parat sig, dräktighet, förlossning och laktation, för haninducerad dräktighet, för honor med tecken på dystoki/långvarig eller svår förlossning.

— Dräktighetstid och, om uppgift finns, förlossningens varaktighet.

— Antalet implantationer, kullstorlek och procentandelen hanungar.

— Antal och procentandel av postimplantationsförlust, levande födda och dödfödda.

▼**M5**

— Data om kullvikt och ungvikt (hanar, honor och i kombination), antalet småväxta ungar om det fastställs.

— Antal ungar med grava synliga missbildningar.

— Toxiska eller andra effekter på avkomman, postnatal tillväxt, levnadsduglighet, etc.

— Uppgifter om fysiska markörer hos ungar och andra postnatala utvecklingsdata.

— Uppgifter om könsmognad hos F_1-djur.

— Uppgifter om funktionsobservationer av ungar och vuxna, i tillämpliga fall.

— Kroppsvikt vid avlivning och absoluta och relativa organviktsdata för P- och vuxna F_1-djur.

— Obduktionsfynd.

— En detaljerad redogörelse av alla histopatologiska fynd.

— Totalt spermieantal i cauda epididymis, procentandel progressivt rörliga spermier, procentandel morfologiskt normala spermier, och procentandel av spermier med varje identifierad abnormitet för P- och F_1-hanar.

— Antal och mognadsstadier för de folliklar som finns i äggstockarna hos P- och F_1-honor, i förekommande fall.

— Uppräkning av gulkroppar i äggstockarna hos F_1-honor.

— Statistisk bearbetning av resultaten, i tillämpliga fall.

Kohort 2 parametrar:

— Detaljerad beskrivning av de förfaranden som används för att standardisera observationer och förfaranden, samt operationella definitioner för att bedöma observationer.

— Förteckning över samtliga testförfaranden, samt motivering för deras användning.

— Närmare uppgifter om de beteendemässiga/funktionella, neuropatologiska och morfometriska förfaranden som används, inklusive information och detaljer om automatiserade enheter.

— Rutiner för kalibrering och säkerställande av likvärdiga enheter och balansen mellan behandlingsgrupperna i testförfarandena.

— Kort motivering som förklarar eventuella beslut som inbegriper en yrkesmässig bedömning.

— Detaljerad beskrivning av alla beteendemässiga/funktionella, neuropatologiska och morfometriska resultat från respektive kön och dosgrupp, omfattande både ökningar och minskningar från kontroller.

— Hjärnvikt.

— Eventuella diagnoser som härrör från neurologiska symtom och skador, inklusive naturligt förekommande sjukdomar eller tillstånd.

— Bilder på typiska exempel på fynd.

— Lågupplösta bilder för att bedöma homologi i snitt som används för morfometri.

▼M5

— Statistisk bearbetning av resultaten, inklusive statistiska modeller som används för att analysera data, och resultaten, oavsett om de var signifikanta eller ej.

— Samband med eventuella toxiska effekter till en slutsats om testkemikaliens neurotoxiska potential, efter kön och dosgrupp.

— Påverkan av eventuell toxikokinetisk information på slutsatserna.

— Data som stöder testmetodens tillförlitlighet och känslighet (dvs. positiva och historiska kontrolldata).

— Eventuella samband mellan neuropatologiska och funktionella effekter.

— Noael eller referensdos för moderdjur och avkomma, för respektive kön och dosgrupp.

— Diskussion om den övergripande tolkningen av data baserat på resultaten, inklusive en slutsats om huruvida kemikalien orsakat utvecklingsneurotoxicitet samt Noael.

Kohort 3 parametrar:

— IgM-antikroppstitrar i serum (sensibilisering mot SRBC eller KLH) eller IgM PFC-enheter i mjälte (sensibilisering mot SRBC).

— TDAR-metodens prestanda bör därför bekräftas som en del av optimeringsprocessen av laboratorier som inför testet för första gången, och med jämna mellanrum (t.ex. årligen) hos alla laboratorier.

— Diskussion om den övergripande tolkningen av data baserat på resultaten, inklusive en slutsats om huruvida kemikalien orsakat utvecklingsimmunotoxicitet samt Noael.

Diskussion av resultaten

Slutsatser, inbegripet Noael-värden för effekter på föräldrar och avkomma

All information som inte erhållits under studien men som är användbara för tolkningen av resultaten (t.ex.likheter med effekter från alla kända neurotoxiska ämnen) bör också lämnas.

Tolkning av resultaten

80. En utökad engenerationsstudie av reproduktionstoxicitet ger information om verkningarna av upprepad exponering för en kemikalie under alla faser av reproduktionscykeln, vid behov. I synnerhet ger studien information om reproduktionssystemet och om utveckling, tillväxt, överlevnad och funktionella endpoints hos avkomma upp till PND 90.

81. Tolkning av studiens resultat bör ta hänsyn till all tillgänglig information om kemikalien, inklusive fysikalisk-kemiska, TK och toxikodynamiska egenskaper, tillgängliga relevanta uppgifter om strukturella analoger, samt resultat från toxicitetsstudier som tidigare genomförts med testkemikalien (t.ex.akut toxicitet, toxicitet efter upprepad applikation, mekanistiska studier och studier som bedömer om det finns betydande kvalitativa och kvantitativa artskillnader för metaboliska egenskaper *in vivo*/*in vitro*). Obduktions- och organviktsresultat bör bedömas i samband med observationer gjorda i andra studier med upprepad dosering, när så är möjligt. Minskningar i avkommans tillväxt kan övervägas i relation till en påverkan av testkemikalien på mjölkens sammansättning (se hänvisning 29).

▼M5

Kohort 2 (utvecklingsneurotoxicitet)

82. Neurobeteendemässiga och neuropatologiska resultat bör tolkas mot bakgrund av samtliga resultat, med hjälp av en metod som bygger på evidensvärde och som involverar expertbedömning. Mönster hos beteendemässiga eller morfologiska fynd bör, om sådana finns, diskuteras, liksom belägg för dos-respons. Bedömningen av utvecklingsneurotoxicitet, inklusive mänskliga epidemiologiska studier eller fallrapporter, samt experimentella djurstudier (t.ex. toxikokinetiska data, struktur-aktivitetsinformation, data från andra toxicitetsstudier) bör ingå i denna karakterisering. Utvärderingen av data bör omfatta en diskussion om både den biologiska och statistiska signifikansen. Utvärderingen bör omfatta eventuella samband mellan observerade neuropatologiska och beteendemässiga förändringar. För vägledning om tolkningen av utvecklingsmässiga neurotoxiska resultat, se testmetod B.53 (se hänvisning 35) och Tyl et al., 2008 (se hänvisning 31).

Kohort 3 (utvecklingsimmunotoxicitet)

83. Undertryckning eller förstärkning av immunfunktion bedömd genom TDAR (T-cellsberoende antikroppsrespons) bör utvärderas mot bakgrund av samtliga iakttagelser som gjorts. Betydelsen av resultatet från TDAR kan stödjas av andra effekter på immunologiskt relaterade indikatorer (t.ex. benmärgens cellularitet, lymfvävnadens vikt och histopatologi, lymfocytdelmängdsfördelning). Effekter som fastställts genom TDAR kan vara mindre meningsfulla vid annan toxicitet som observerats vid lägre exponering.

84. OECD:s vägledning 43 bör användas som stöd vid tolkningen av reproduktions- och neurotoxicitetsresultaten (se hänvisning 26).

HÄNVISNINGAR

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 och 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, och 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 och 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 och J.I. Goodman (1999), 'Stimulating Research to Improve the Scientific Basis of Risk Assessment', *Toxicological Sciences*, 49, 1–4.

6. Ulbrich, B. och 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 och 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 och 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 och 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 och 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 och 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 och 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 och 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 och 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 och 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 och 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 och S. Schrader (1992), 'Methods for Assessing Rat Sperm Motility', *Reproductive Toxicology*, 6, 267–273.

21. Klinefelter, G.R., N.L. Roberts och 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 och S.D. Perreault (1991), 'Rat Sperm Motility Analysis: Methodologic Considerations', *Reproductive Toxicology*, 5, 449–458.

▼**M5**

23. Slott, V.L. och 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 och 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 och 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, och 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 och 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 och 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 denna bilaga, Test avseende neurotoxicitet på gnagare.

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 denna bilaga, Studie av utvecklingsneurotoxicitet.

36. Kapitel B.54 i denna bilaga, Uterotrof bioassay på gnagare: Ett korttidsscreeningtest för östrogena egenskaper.

37. Kapitel B.55 i denna bilaga, Hershbergers bioassay på råtta: Ett korttidsscreeningtest för (anti-)androgena egenskaper.

▼**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 Kanada, 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**

Tillägg 1

Mått och observationer som ingår i testbatteriet för funktionsobservation (kohort 2A)

Bur & öppet område	Manipulation	Fysiologi
Hållning	Enkelt avlägsnande	Temperatur
Ofrivilliga kloniska & toniska rörelser	Lätthanterlighet	Kroppsvikt
Ögonlocksstängning	Muskeltonus	Pupillrespons
Piloerektion	Respons på närmande	Pupillstorlek
Salivavsöndring	Respons på beröring	
Tårbildning	Auditiv respons	
Läten	Respons på nyp i svans	
Ungvårdnad	Upprätningsrespons	
Gångrubbningar	Fotspridning vid landning	
Upphetsning	Frambensgreppstyrka	
Stereotypi	Bakbensgreppstyrka	
Bisarrt beteende		
Fläckar		
Respiratoriska avvikelser		

▼**M5**

Tillägg 2

DEFINITIONER

Kemikalie: Ett ämne eller en blandning.

Testkemikalie: Alla ämnen eller blandningar som testas med denna testmetod.

▼M5

B.57 **H295R STEROIDOGENESTEST**

INLEDNING

1. Denna testmetod motsvarar OECD:s testriktlinje (TG) 456 (2011). OECD inledde en högprioriterad verksamhet under 1998 för att se över befintliga, och ta fram nya, testriktlinjer för screening och testning av potentiellt hormonstörande kemikalier. OECD:s konceptuella ram för testning och bedömning av endokrinstörande kemikalier från 2002 består av fem nivåer, varje nivå motsvarar en annan nivå av biologisk komplexitet (se hänvisning 1). H295R steroidogenestestet *in vitro* (H295R) som beskrivs i denna testmetod använder en mänsklig adreno-karcinomcellinje (NCI-H295R-celler) och utgör ett *in vitro*-test på nivå 2 som ger mekanistiska data och som ska användas för screenings- och prioriteringsändamål. Utvecklingen och standardiseringen av testet som en screening av kemiska effekter på steroidogenes, särskilt produktionen av 17β-östradiol (E2) och testosteron (T), genomfördes i en flerstegsprocess. H295R- testet har optimerats och validerats (se hänvisning 2, 3, 4, 5).

2. Syftet med H295R-steroidogenestestet är att upptäcka kemikalier som påverkar produktionen av E2 och T. H295R-testet är avsedd att identifiera xenobiotika som har som sitt mål de endogena komponenter som utgör den intracellulära biokemiska väg som börjar med sekvensen av reaktioner från kolesterol till produktionen av E2 och/eller T. H295R-testet syftar inte till att identifiera kemikalier som påverkar steroidogenes beroende på effekter på hypotalamus-hypofys-gonad (HPG) axeln. Målet med testet är att ge svaret JA eller NEJ när det gäller en kemikalies potential att inducera eller hämma produktionen av T och E2, dock kan kvantitativa resultat erhållas i vissa fall (se punkterna 53 och 54). Testresultaten uttrycks som relativa förändringar i hormonproduktionen jämfört med kontroller med lösningsmedel. Testet syftar inte till att tillhandahålla specifik mekanistisk information om interaktionen av testkemikalien med det endokrina systemet. Forskning har bedrivits med användning av cellinjen för att identifiera effekter på specifika enzymer och intermediära hormoner såsom progesteron (se hänvisning 2).

3. Definitioner och förkortningar som används i denna testmetod beskrivs i tillägget. Ett detaljerat protokoll, inklusive anvisningar om hur man bereder lösningar, odlar celler och utför olika aspekter av testet finns som tillägg I–III till OECD:s dokument *Multi-Laboratory Validation of the H295R Steroidogenesis Assay to Identify Modulators of Testosterone and Estradiol Production* (se hänvisning 4).

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN OCH BEGRÄNSNINGAR

4. Fem olika enzymer som katalyserar sex olika reaktioner är involverade i biosyntesen för könssteroidhormon. Enzymatisk omvandling av kolesterol till pregnenolon med cytokrom P450 (CYP)-kolesterol-sidokedjeklyvningsenzym (CYP11A) utgör det första steget i en serie av biokemiska reaktioner som kulminerar i syntesen av steroidslutprodukter. Beroende på ordningsföljden för de följande två reaktionerna klyvs den steroidogena syntesvägen i två banor, Δ^5-hydroxisteroidvägen och Δ^4-ketosteroidvägen, som konvergerar i produktionen av androstendion (figur 1).

5. Androstendion omvandlas till testosteron (T) av 17β-hydroxisteroid-dehydrogenas (17β-HSD). Testosteron är både en intermediär och en hormonslutprodukt. Hos hanar kan T omvandlas till dihydrotestosteron (DHT) av 5α-reduktas som finns i cellmembran, kärnhölje och endoplasmatiskt retikulum hos målvävnaderna för androgen verkan, såsom prostata och sädesblåsor. DHT är signifikant mer potent som en androgen än T och anses också vara en homonslutprodukt. H295R-testet mäter inte DHT (se punkt 10).

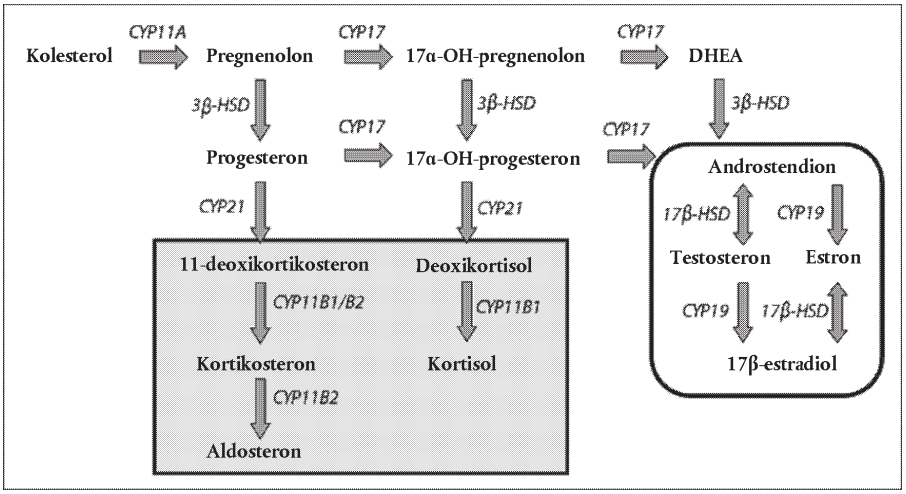
▼M5

6. Enzymet i den steroidogena vägen som omvandlar androgenkemikalier till östrogena kemikalier är aromatashämmare (CYP19). CYP19 konverterar T till 17β-östradiol (E2) och androstendion till östron. E2 och T anses vara hormonslutprodukter för den steroidogena vägen.

7. Specificiteten hos CYP17:s lyasaktivitet skiljer sig för de intermediära substraten bland arterna. Hos människor gynnar enzymet substraten enligt Δ^5-hydroxisteroid-reaktionsvägen (pregnenolon), medan substraten i Δ^4-ketosteroidvägen (progesteron) gynnas hos råttor (se hänvisning 19). Sådana skillnader i CYP17:s lyasaktivitet kan förklara vissa artberoende skillnader i reaktioner på kemikalier som förändrar steroidogenes *in vivo* (se hänvisning 6). H295-celler har visat sig bäst reflektera mänskliga vuxna adrenalenzymuttryck och hormonproduktionsmönster (se hänvisning 20) men är kända för att uttrycka enzymer för både Δ^5-hydroxisteroid- och Δ^4-ketosteroidvägarna för androgensyntesen (se hänvisning 7, 11, 13, 15).

Figur 1

Steroidogen väg i H295R-celler



Anmärkning:

Enzymer är kursiverade, hormoner i fetstil och pilar anger riktningen för syntesen. Grå bakgrund indikerar kortikosteroidvägar/-produkter. Könssteroidvägar/-produkter är inringade. CYP = cytokrom P450, HSD = hydroxisteroiddehydrogenas, DHEA = dehydroepiandrosteron.

8. Den mänskliga H295R-adreno-karcinom-cellinjen är en användbar *in vitro*-modell för undersökning av effekter på steroidhormonsyntesen (se hänvisning 2, 7, 8, 9, 10). H295R-cellinjen uttrycker gener som kodar för alla viktiga enzymer för steroidogenes som nämns ovan (se hänvisning 11, 15) (figur 1). Detta är en unik egenskap, eftersom *in vivo*-uttryck hos dessa gener är vävnads- och utvecklingsstadiespecifika, och det är normalt ingen enskild vävnad eller enskilt utvecklingsstadium som uttrycker alla gener som är inblandade i steroidogenes (se hänvisning 2). H295R-celler har fysiologiska egenskaper som zonala odifferentierade humana fetala adrenala celler (se hänvisning 11). Cellerna representerar ett unikt *in vitro*-system genom att de har förmågan att producera alla de steroidhormoner som finns i den vuxna binjurebarken och könskörtlarna, vilket medger testning av effekter på såväl kortikosteroidsyntesen och produktionen av könssteroidhormoner såsom androgener och östrogener. Testet validerades dock endast för att detektera T och E2. Förändringar som registrerats av testsystemet i form av förändringar i produktionen av T och E2 kan vara resultatet av en

▼M5

mängd olika interaktioner av testkemikalier med steroidogena funktioner som uttrycks genom H295R-celler. Dessa inkluderar uttrycksmodulering, syntes eller funktion hos enzymer som är involverade i produktion, omvandling eller eliminering av steroidhormoner (se hänvisning 12, 13, 14). Hämning av hormonproduktion kan bero på direkt konkurrerande bindning till ett enzym i syntesvägen, påverkan av samfaktorer som NADPH (nikotinamidadenindinukleotidfosfat) och cAMP (cykliskt adenosinmonofosfat), och/eller ökning av steroidmetabolism eller undertryckande av genuttrycket hos vissa enzymer i steroidogenesens syntesväg. Även om inhibition kan vara en funktion av både direkta och indirekta processer involverade i hormonproduktionen, är induktion typiskt av en indirekt karaktär, genom att till exempel påverka samfaktorer såsom NADPH och cAMP (som i fallet med forskolin), minskande steroidmetabolism (se hänvisning 13) och eller uppreglering av ett steroidogent genuttryck.

9. H295R-testet har flera fördelar:

— Den möjliggör detektion av både ökningar och minskningar i produktionen av både T och E2.

— Den gör det möjligt att direkt bedöma de potentiella effekterna av en kemikalie på cellviabilitet/cytotoxicitet. Detta är en viktig egenskap eftersom den gör det möjligt att skilja mellan effekter som beror på cytotoxicitet och effekter som beror på direkt interaktion av kemikalier via steroidogena syntesvägar, vilket inte är möjligt i vävnadsexplantatsystem som består av flera celltyper med olika känslighet och funktioner.

— Den kräver inte användning av djur.

— H295R-cellinjen finns kommersiellt tillgänglig.

10. De principiella begränsningarna för testet är följande:

— Dess metaboliska kapacitet är okänd men förmodligen ganska begränsad. Därför kommer kemikalier som metaboliskt måste aktiveras troligen att saknas i detta test.

— Eftersom H295R-enzymer härrör från adrenal vävnad har de förmågan att producera gluko- och mineralkortikoider såväl som könshormoner och därför kan effekter på produktionen av gluko- och mineralkortikoider påverka nivåerna av T-och E2 som observeras i testet.

— Den mäter inte DHT och förväntas därför inte detektera kemikalier som hämmar 5α-reduktas, i de fallen kan Hershbergers bioassay (se hänvisning 16) användas.

— H295R-testet detekterar inte kemikalier som stör steroidogenes genom att påverka hypotalamus-hypofys-gonad-axeln (HPG) eftersom detta endast kan studeras hos intakta djur.

PRINCIP FÖR TESTMETODEN

11. Syftet med testet är att upptäcka kemikalier som påverkar T- och E2-produktionen. T är också en mellanprodukt i syntesvägen för E2. Testet kan detektera kemikalier som normalt hämmar eller inducerar enzymerna i steroidogenesens reaktionsväg.

▼M5

12. Testet utförs vanligtvis under standardcellodlingsbetingelser i odlingsplattor med 24 hål. Alternativt kan andra plattstorlekar användas för att genomföra testet, men ympning och experimentella förhållanden bör justeras i enlighet därmed för att upprätthålla prestandakriteriernas efterlevnad.

13. Efter en acklimatiseringsperiod på 24 timmar på flerhålsplattor exponeras cellerna under 48 timmar för sju koncentrationer av testkemikalien i minst tre replikat. Lösningsmedel och en känd inhibitor och inducerare av hormonproduktion körs vid en bestämd koncentration som negativ och positiv kontroll. Vid slutet av exponeringsperioden avlägsnas mediet från varje hål. Cellviabiliteten i varje hål analyseras omedelbart efter att mediet tagits bort. Koncentrationer av hormoner i mediet kan mätas med många olika metoder inklusive kommersiellt tillgängliga hormonmätningsutrustningar och/eller instrumentella metoder, som till exempel vätskekromatografi-masspektrometri (LC-MS). Data uttrycks som X-faldig förändring i förhållande till lösningsmedelskontrollen och den lägsta koncentrationen med observerad effekt (LOEC). Om testet är negativt, rapporteras den högsta testade koncentrationen som nolleffektkoncentration (NOEC). Slutsatser om en kemikalies förmåga att påverka steroidogenes bör baseras på minst två oberoende testomgångar. Den första testomgången kan användas för att bestämma dos med efterföljande justering av koncentrationer för omgång 2 och 3, i tillämpliga fall, om löslighets- eller cytotoxicitetsproblem påträffas eller kemikaliens aktivitet verkar vara i slutet av det testade koncentrationsintervallet.

ODLINGSFÖRFARANDE

Cellinje

14. NCI-H295R-celler finns kommersiellt tillgängliga från *American Type Culture Collections* (ATCC) efter ett undertecknande av ett avtal om materialöverföring (*Material Transfer Agreement*, MTA) ([1]).

Inledning

15. På grund av förändringar i den E2-producerande förmågan hos cellerna med ökande ålder/passager (se hänvisning 2) bör cellerna odlas efter ett särskilt protokoll innan de används och antalet passager sedan cellerna tinades såväl som passagenumret då cellerna frystes och placerades i förvaring i flytande kväve ska noteras. Den första siffran anger det faktiska cellpassagenumret och den andra siffran beskriver passagenumret då cellerna frystes och placerades i lager. Till exempel ska celler som frysts efter passage fem och tinats och sedan delats tre gånger (4 passager om man räknar de nyligen upptinade cellerna som passage 1) efter att de odlats igen märkas passage 4.5. Ett exempel på ett numreringsschema återfinns i tillägg I till valideringsrapporten (se hänvisning 4).

16. Lagringsmediet används som bas för det berikade mediet och frysmediet. Berikat medium är en nödvändig komponent för odling av celler. Frysmediet är särskilt utformat för att medge opåverkad frysning av celler för långtidsförvaring. Före användning bör Nu-serum (eller ett jämförbart serum med samma egenskaper som har visat sig ge data som uppfyller testprestanda- och kvalitetskontrollkraven (QC)), som är en beståndsdel i berikade medier, analyseras för bakgrundskoncentrationer av T och E2. Beredningen av dessa lösningar beskrivs i tillägg II till valideringsrapporten (se hänvisning 4).

([1]) ATCC CRL-2128; ATCC, Manassas, VA, Förenta staterna, http://www.lgcstandards-atcc.org/

▼M5

17. Efter inledandet av en H295R-cellodling från en ursprunglig ATCC-sats, bör celler odlas i fem passager (dvs. cellerna delas 4 gånger). Passagefemceller fryses sedan ner i flytande kväve för lagring. Innan cellerna fryses ner, körs ett urval av tidigare passagefyra-celler på en QC-platta (se punkt 36 och 37) för att kontrollera om den basala produktionen av hormoner och responsen på positiva kontrollkemikalier uppfyller kvalitetskontrollkriterierna för testet enligt definitionen i tabell 5.

18. H295R-celler måste odlas, frysas och lagras i flytande kväve för att säkerställa att det alltid finns celler för lämplig passage/ålder för odling och användning. Det maximala antalet passager efter att ha tagit en ny ([1]) eller fryst ([2]) sats av celler till odling som är godtagbart för användning i H295R-testet bör ej överstiga 10. Till exempel skulle godtagbara passager för odlingar av celler från ett parti fryst vid passage 5 vara 4.5 till 10.5. För celler som startades från dessa frysta partier bör det förfarande som beskrivs i punkt 19 följas. Dessa celler ska odlas i minst fyra (4) ytterligare passager (passage 4.5) innan de används för testning.

Utgångsceller från fryst lager

19. Förfarandet för att starta celler från fryst lager ska användas när en ny sats av celler avlägsnas från lagringen i flytande kväve för odling och testning. Detaljer för detta förfarande framgår av tillägg III till valideringsrapporten (se hänvisning 4). Celler tas ut ur lagret med flytande kväve, tinas snabbt, placeras i berikat medium i ett centrifugrör, centrifugeras vid rumstemperatur, återsuspenderas i berikat medium och överförs till en odlingskolv. Mediet bör bytas påföljande dag. H295R-cellerna odlas i en apparat för odling av bakterier vid 37 °C med 5 % CO_2 i luftatmosfär och mediet förnyas 2–3 gånger per vecka. När cellerna når ca 85–90 % konfluens bör de delas. Uppdelning av cellerna är nödvändig för att säkerställa cellernas hälsa och tillväxt och för att bibehålla celler till bioassayer. Cellerna sköljs tre gånger med fosfatbuffrad saltlösning (PBS, utan Ca^{2+} Mg^{2+}) och släpps fria från odlingskolven genom tillsats av ett lämpligt lösgörande enzym, t.ex.trypsin i PBS (utan Ca^{2+} Mg^{2+}). Omedelbart efter att cellerna har lossats från odlingskolven bör enzymaktiviteten stoppas med tillsats av berikat medium med ett förhållande på 3 gånger den volym som använts vid enzymbehandlingen. Cellerna placeras i ett centrifugrör, centrifugeras vid rumstemperatur, supernatanten avlägsnas och pelleten av celler återsuspenderas i berikat medium. Lämplig mängd av cellösningen placeras i den nya odlingskolven. Mängden cellösning bör justeras så att cellerna är utväxta inom 5–7 dagar. Det rekommenderade sub-odlingsförhållandet är 1:3 till 1:4. Plattan ska märkas noga. Cellerna är nu redo för att användas i testet och överskottet av celler bör frysas i flytande kväve, såsom beskrivs i punkt 20.

([1]) Med *ny sats* avses en ny sats av celler erhållna från ATCC.
([2]) Med *fryst sats* avses celler som tidigare har odlats och sedan frysts vid ett annat laboratorium än ATCC.

▼M5

Frysning av H295R-celler (förberedning av celler för förvaring i flytande kväve)

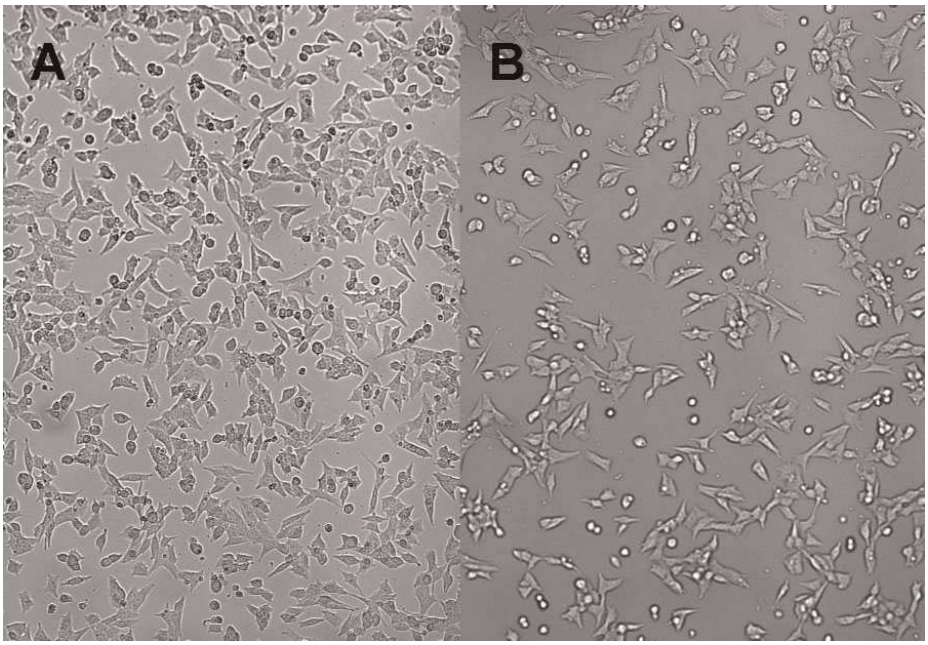
20. För att förbereda H295R-celler för frysning, bör det ovan beskrivna förfarandet för att dela celler följas fram till steget för återsuspendering av pelleten av celler i botten av centrifugröret. Här återsuspenderas pelleten av celler i frysmediet. Lösningen överförs till ett kryorör, märkt på lämpligt sätt, och fryses vid – 80 °C under 24 timmar, varefter kryoröret överförs till flytande kväve för lagring. Detaljer för detta förfarande framgår av tillägg III till valideringsrapporten (se hänvisning 4).

Utstrykning och förinkubation av celler för testning

21. Antalet 24-hålsplattor, preparerade i enlighet med punkt 19, som kommer att behövas beror på hur många kemikalier som ska testas och cellernas konfluens i odlingsskålarna. Som en allmän regel, tillhandahåller en odlingskolv (75 cm^2) med 80–90 % konfluenta celler tillräckligt många celler för 1–1,5 (24-håls) platta med en måldensitet på 200 000 till 300 000 celler per ml medium som leder till cirka 50–60 % konfluens i hålen efter 24 timmar (figur 2). Detta är vanligtvis den optimala celldensiteten för hormonproduktion i testet. Vid högre densiteter förändras produktionsmönstret för T såväl som för E2. Innan man genomför testet för första gången, rekommenderas det att man testar olika ympningsdensiteter på mellan 200 000 och 300 000 celler per ml och densiteten som resulterar i 50–60 % konfluens i hålen efter 24 timmar väljs för ytterligare försök.

Figur 2

Mikrofoto av H295R-celler med en odlingstäthet på 50 % i en 24-håls odlingsplatta efter 24 timmar som tagits vid kanten (A) och centrum (B) av ett hål



22. Mediet pipetteras från odlingskolven och cellerna sköljs 3 gånger med steril PBS (utan $Ca^{2+}Mg^{2+}$). En enzymlösning (i PBS) tillsätts för att lösgöra cellerna från odlingskolven. När det gått en lämplig tid för cellerna att lossna bör enzymverkan stoppas med tillsats av berikat medium med ett förhållande på 3 gånger den volym som används för enzymbehandlingen. Cellerna placeras i ett centrifugrör, centrifugeras vid rumstemperatur, supernatanten avlägsnas och pelleten av celler återsuspenderas i berikat medium.

▼M5

Celldensiteten beräknas med t.ex. en hemocytometer eller cellräknare. Cellösningen späds till önskad plattodlingsdensitet och blandas noggrant för att säkerställa en homogen celltäthet. Cellerna sprids ut med 1 ml cellösning per hål och plattorna och hålen märks. De ympade plattorna inkuberas vid 37 °C med 5 % CO_2 i luftatmosfär under 24 timmar för att tillåta cellerna att fästa i hålen.

KRAV PÅ KVALITETSKONTROLL

23. Det är viktigt att exakta volymer av lösningar och prover fördelas i hålen vid doseringen eftersom dessa volymer bestämmer de koncentrationer som används vid beräkningarna av testresultaten.

24. Före inledning av cellodling och eventuell efterföljande testning, bör varje laboratorium visa känsligheten hos sitt hormonmätsystem (punkterna 29–31).

25. Om antikroppsbaserade hormonmätningstester ska användas bör testkemikalierna, innan testningen inleds, analyseras för sin potential att störa det mätsystem som används för att kvantifiera T och E2 enligt beskrivningen i punkt 32.

26. DMSO är det rekommenderade lösningsmedlet för testet. Om ett alternativt lösningsmedel används, ska följande fastställas:

— Lösligheten av testkemikalien, forskolin och prokloraz i lösningsmedlet samt

— cytotoxiciteten som en funktion av koncentrationen av lösningsmedlet.

Det rekommenderas att den maximalt tillåtna koncentrationen lösningsmedel inte bör överskrida 10 gånger spädningen av den minst cytotoxiska koncentrationen av lösningsmedlet.

27. Innan testet genomförs för första gången, bör laboratoriet genomföra ett kvalificerande experiment som visar att laboratoriet kan bibehålla och uppnå lämpliga betingelser för cellodling och försök som krävs för kemisk provning enligt punkterna 33–35.

28. Vid inledning av testning med ett nytt parti, bör en kontrollodlingsplatta köras innan man använder en ny sats celler för att utvärdera prestandan hos de celler som beskrivs i punkterna 36 och 37.

Prestandan hos hormonmätsystemet

Metodens känslighet, noggrannhet, precision och korsreaktivitet med provmatris

29. Varje laboratorium kan själva välja ett hormonmätsystem för analysen av produktionen av T och E2 med H295R-celler så länge det uppfyller prestandakriterierna, inklusive kvantifieringsgränsen (LOQ). Nominellt är dessa 100 pg/ml för T och 10 pg/ml för E2, vilket grundas på de basala hormonnivåer som observerats i valideringsstudierna. Emellertid kan högre eller lägre nivåer vara lämpliga beroende på de basala hormonnivåer som uppnåtts i det utförande laboratoriet. Innan starten av QC-platta och provomgångar bör laboratoriet visa att hormontestet som ska användas kan mäta hormonhalter i berikat medium med tillräcklig noggrannhet och precision för att uppfylla de QC-kriterier som anges i tabellerna 1 och 5, genom att analysera berikat medium som spikats med en intern hormonkontroll. Berikat medium bör spikas med minst tre koncentrationer av varje hormon

▼M5

(t.ex.100, 500 och 2 500 pg/ml T; 10, 50 och 250 pg/ml av E2, eller de lägsta möjliga koncentrationerna baserade på detektionsgränserna för det valda hormonmätsystemet kan användas för de lägsta spikkoncentrationerna av T och E2) och analyseras. Uppmätta hormonkoncentrationer för icke-extraherade prover ska ligga inom 30 % av de nominella koncentrationerna, och variationen mellan upprepade mätningar av samma prov bör inte överstiga 25 % (se även tabell 8 för ytterligare QC-kriterier). Om dessa QC-kriterier uppfylls antas det att den valda hormonmätningstestet är tillräckligt noggrann och exakt och inte korsreagerar med komponenter i mediet (provmatrisen) så att en betydande påverkan på testresultatet kan förväntas. I detta fall krävs ingen extraktion av proverna före hormonmätningarna.

30. I fall QC-kriterierna i tabell 1 och 8 inte uppfylls, kan en betydande matriseffekt förekomma och ett experiment med extraherat spikat medium bör genomföras. Ett exempel på ett extraktionsförfarande beskrivs i tillägg II till valideringsrapporten (se hänvisning 4). Mätningar av hormonkoncentrationer i de extraherade proverna bör göras med tre replikat ([1]). Om man efter extraktionen kan påvisa att komponenterna i mediet inte stör hormondetekteringsmetoden såsom definieras av QC-kriterierna, bör alla ytterligare försök utföras med de extraherade proverna. Om QC-kriterierna inte kan uppfyllas efter extraktionen, är det använda hormonmätsystemet inte lämpligt för H295R-steroidogenestestet, och en alternativ hormondetekteringsmetod bör användas.

Standardkurva

31. Hormonkoncentrationerna i lösningskontrollerna (SC) bör ligga inom den linjära delen av standardkurvan. Företrädesvis bör SC-värdena ligga nära mitten av den linjära delen för att säkerställa att induktion och inhibering av hormonsyntesen kan mätas. Utspädningar av medium (eller extrakt) som ska mätas ska väljas i enlighet därmed. Det linjära förhållandet ska bestämmas med en lämplig statistisk metod.

Kemiskt interferenstest

32. Om antikroppsbaserade analyser såsom enzymkopplade immunadsorberande analyser (Elisa) och radioimmunanalyser (RIA) ska användas för att mäta hormoner, bör varje kemikalie testas för potentiell störning av det hormonmätsystem som ska användas före starten av den faktiska kemikalietestningen (tillägg III till valideringsrapporten [se hänvisning 4]), eftersom vissa kemikalier kan störa dessa tester (se hänvisning 17). Om störningar inträffar som är ≥ 20 % av den basala hormonproduktionen av T och/eller E2 som bestämts genom hormonanalys, bör *Chemical Hormone Assay Interference*-testet (som beskrivs i tillägg III till valideringsrapporten [se hänvisning 4] avsnitt 5.0) utföras för alla utspädningar av testkemikaliestamlösning för att

([1]) *Anm.:* Om extraktion krävs, utförs tre upprepade mätningar för varje extrakt. Varje prov extraheras endast en gång.

▼M5

identifiera den tröskeldos vid vilken betydande (≥ 20 %) interferens uppträder. Om interferensen är mindre än 30 % kan resultaten korrigeras avseende interferens. Om interferensen överstiger 30 % är data ogiltiga och ska kasseras vid dessa koncentrationer. Om betydande interferens av en testkemikalie med ett hormonmätsystem uppträder vid mer än en icke-cytotoxisk koncentration, bör ett annat hormonmätsystem användas. För att undvika störningar från förorenande kemikalier rekommenderas att hormoner extraheras från mediet med hjälp av ett lämpligt lösningsmedel, möjliga metoder finns i valideringsrapporten (se hänvisning 4).

Tabell 1

Prestandakriterier för hormonmätsystem

Parameter	Kriterium
Mätmetodens känslighet	Kvantifieringsgränsen (LOQ) T: 100 pg/ml; E2: 10 pg/ml [a]
Hormonextraktionseffektivitet (endast när extraktion behövs)	De genomsnittliga återvinningsnivåerna (baserat på mätning i tre replikat) för de spikade mängderna av hormon bör inte avvika mer än 30 % från den mängd som tillsatts
Kemisk interferens (endast antikroppsbaserade system)	Ingen betydande (≥ 30 % av basal hormonproduktion av respektive hormon) korsreaktivitet med någon av de hormoner som produceras av cellerna ska inträffa [b] [c]

[a] *Anm.:* Metodens mätgränser baseras på de basala hormonproduktionsvärden som anges i tabell 5, och är prestationsbaserade. Om man kan uppnå ökad basal hormonproduktion så kan gränsen vara större.

[b] Vissa T- och E2-antikroppar kan korsreagera med androstendion och östron, respektive, vid en större procentandel. I sådana fall är det inte möjligt att exakt fastställa effekterna på 17β-HSD. Däremot kan data fortfarande ge användbar information om effekterna på östrogen eller androgen produktion i allmänhet. I sådana fall bör data uttryckas som androgen/östrogen respons snarare än E2 och T.

[c] Dessa inkluderar: kolesterol, pregnenolon, progesteron, 11-deoxikortikosteron, kortikosteron, aldosteron, 17α-pregnenolon, 17α-progesteron, deoxikortisol, kortisol, DHEA, androstendion, östron.

Kvalifikationsprövning av laboratorium

33. Före testning av okända kemikalier bör ett laboratorium visa att det kan uppnå och bibehålla de lämpliga cellodlings- och testbetingelser som krävs för ett framgångsrikt genomförande av testet, genom en kvalifikationsprövning av laboratoriet. Eftersom resultatet av ett test är direkt kopplat till den laboratoriepersonal som utför testet bör dessa förfaranden delvis upprepas om en förändring av laboratoriepersonal sker.

34. Kvalifikationsprövningen ska genomföras med samma förutsättningar som anges i punkterna 38 till 40 genom att exponera celler för 7 ökande koncentrationer av starka, måttliga och svaga inducerare och hämmare samt en negativ kemikalie (se tabell 2). Specifikt ska de kemikalier som testas inkludera den starka induceraren forskolin (CAS-nr 66575-29-9), den starka hämmaren prokloraz (CAS-nr 67747-09-5), den måttliga induceraren atrazin

▼M5

(CAS-nr 1912-24-9), den måttliga hämmaren aminoglutetimid (CAS-nr 125-84-8), den svaga induceraren (E2-produktion) och den svaga hämmaren (T-produktion) bisfenol A (CAS-nr 80-05-7) samt den negativa kemikalien mänskligt korioniskt gonadotropin (HCG) (CAS-nr 9002-61-3), såsom visas i tabell 2. Separata plattor odlas för alla kemikalier med användning av det format som visas i tabell 6. En QC-platta (tabell 4, punkterna 36–37) bör inkluderas vid varje daglig odling av kvalifikationskemikalierna.

Tabell 2

Kvalifikationskemikalier och exponeringskoncentrationer

Kvalifikationskemikalie	Testkoncentrationer [μM]
Prokloraz	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
Aminoglutetimid	0 ([a]), 0,03, 0,1, 1, 3, 10, 30, 100
Bisfenol A	0 ([a]), 0,03, 0,1, 1, 3, 10, 30, 100
HKG	0 ([a]), 0,03, 0,1, 1, 3, 10, 30, 100

([a]) Lösningsmedel (DMSO)-kontroll (0), 1 μl DMSO/hål.

Exponering av H295R för kvalifikationskemikalier bör utföras på 24-håls odlingsplattor vid laboratoriets kvalifikationsprövning. Doseringen är i μM för samtliga testkemikaliedoser. Doserna ska administreras i DMSO med 0,1 % v/v per hål. Alla testkoncentrationer bör testas i tre hål (tabell 6). Separata plattor odlas för varje kemikalie. En QC-platta inkluderas för varje daglig omgång.

35. Cellviabilitets- och hormonanalys genomförs i enlighet med punkterna 42 till 46. Tröskelvärdet (lägsta koncentration med observerad effekt, LOEC) och klassificeringsbeslut bör redovisas och jämföras med värdena i tabell 3. Uppgifterna anses godtagbara om de uppfyller LOEC och klassificeringsbeslut i tabell 3.

Tabell 3

Tröskelvärden (LOEC) och klassificeringsbeslut avseende kvalifikationskemikalier

	CAS-nr	LOEC [μM]		Klassificeringsbeslut	
		T	E2	T	E2
Prokloraz	67747-09-5	≤ 0,1	≤ 1,0	+ ([a]) (inhibition)	+ (inhibition)
Forskolin	66575-29-9	≤ 10	≤ 0,1	+ (induktion)	+ (induktion)
Atrazin	1912-24-9	≤ 100	≤ 10	+ (induktion)	+ (induktion)
Aminoglutetimid	125-84-8	≤ 100	≤ 100	+ (inhibition)	+ (inhibition)

▼M5

	CAS-nr	LOEC [μM]		Klassificeringsbeslut	
		T	E2	T	E2
Bisfenol A	80-05-7	≤ 10	≤ 10	+ (inhibition)	+ (induktion)
HKG	9002-61-3	inte tillämpligt	inte tillämpligt	Negativ	Negativ

([a]) +, positiv
inte tillämpligt: inte tillämpligt eftersom inga ändringar inträffar efter exponering av icke-cytotoxiska koncentrationer för negativ kontroll.

Kvalitetskontrollplatta

36. Kvalitetskontrollplattan (QC) används för att kontrollera prestanda hos H295R-celler under standardodlingsbetingelser, och för att upprätta en historisk databas för hormonkoncentrationer i lösningsmedelskontroller, positiva och negativa kontroller, samt andra QC-mått över tiden.

— H295R-cellprestandan bör bedömas med hjälp av en QC-platta för varje nytt ATCC-parti eller efter användningen av ett tidigare fryst lager av celler för första gången, om inte laboratoriets kvalifikationsprövning (punkterna 32–34) har genomförts med denna sats av celler.

— En QC-platta ger en fullständig bedömning av de testförhållanden (t.ex. cellviabilitet, lösningsmedelkontroller, negativa och positiva kontroller, samt variation mellan och inom tester) när man testar kemikalier och bör ingå i varje testomgång.

37. QC-provningen ska utföras på en 24-hålsplatta och följer samma förfaranden som för inkubation, dosering, cellviabilitet/cytotoxicitet, hormonextraktion och hormonanalys som beskrivs i punkterna 38 till 46 för testning av kemikalier. QC-plattan innehåller blankämnen, lösningsmedelskontroller och två koncentrationer av en känd inducerare (forskolin, 1 μM, 10 μM) och hämmare (prokloraz, 0,1 μM, 1 μM) av E2- och T-syntes. Dessutom används MeOH i vissa hål som en positiv kontroll för viabilitets-/cytotoxicitetstestet. En detaljerad beskrivning av plattans utformning ges i tabell 4. De kriterier som ska uppfyllas för QC-plattan anges i tabell 5. Den minsta basala hormonproduktionen för T och E2 ska uppfyllas i både lösningsmedelskontrollen och blankhålen.

Tabell 4

Kvalitetskontrollplattans utformning för att testa prestandan hos oexponerade H295R-celler och celler som utsätts för kända hämmare (PRO = prokloraz) och stimulatorer (FOR = forskolin) av E2- och T-produktion. Efter avslutning av exponeringsexperimentet och avlägsnande av mediet, tillsätts en 70 % metanollösning i samtliga MeOH-hål för att fungera som en positiv kontroll för cytotoxicitet (se cytotoxicitetstest i tillägg III till valideringsrapporten [hänvisning 4])

	1	2	3	4	5	6
A	Blank ([a])	Blank ([a])	Blank ([a])	Blank ([a]) (+ MeOH) ([b])	Blank ([a]) (+ MeOH) ([b])	Blank ([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 blankhål får endast medium (dvs. inget lösningsmedel).
([b]) Metanol (MeOH) tillsätts efter att exponeringen har avslutats och mediet avlägsnas från dessa hål.
([c]) DMSO-lösningsmedelskontroll (1 μl/hål).

Tabell 5

Prestandakriterier för kvalitetskontrollplatta

	T	E2
Basalproduktion av hormonet i lösningsmedelskontrollen (SC)	≥ 5 gånger LOQ	≥ 2,5 gånger LOQ
Induktion (10 μM forskolin)	≥ 1,5 gånger SC	≥ 7,5 gånger SC
Inhibition (1μM prokloraz)	≤ 0,5 gånger SC	≤ 0,5 gånger SC

KEMISKT EXPONERINGSFÖRFARANDE

38. De förinkuberade cellerna ska avlägsnas från inkubatorn (punkt 21) och kontrolleras i mikroskop för att säkerställa att de är i gott skick (fastsättning, morfologi) före doseringen.

39. Cellerna placeras i ett biosäkerhetsskåp och det berikade mediet avlägsnas och ersätts med ett nytt berikat medium (1 ml/hål). DMSO är det lösningsmedel som föredras för denna testmetod. Men om det finns skäl att använda andra lösningsmedel bör den vetenskapliga grunden beskrivas. Cellerna exponeras för testkemikalien genom att 1 μl av lämplig stamlösning tillsätts DMSO (se tillägg II till valideringsrapporten [hänvisning 4]) per 1 ml berikat medium (hålvolym). Detta resulterar i en slutlig koncentration av 0,1 % DMSO i hålen. För att säkerställa adekvat blandning föredras i allmänhet att den lämpliga stamlösningen av testkemikalien i DMSO blandas med berikat medium för erhållande av den önskade slutkoncentrationen för varje dos, och blandningen tillsätts varje hål omedelbart efter borttagandet av gammalt medium. Om detta alternativ används bör koncentrationen av DMSO (0,1 %) vara oförändrat för alla hål. De hål som innehåller de största två koncentrationerna bedöms visuellt, avseende bildning av fällningar eller grumlighet som en indikation på ofullständig löslighet av testkemikalien, med hjälp av ett stereomikroskop. Om sådana tillstånd (grumlighet, fällningsformationer) observeras, granskas också de hål som innehåller de närmaste lägre koncentrationerna (och så vidare) och koncentrationer som inte helt löser sig undantas från vidare utvärdering och analys. Plattan återförs till inkubatorn vid 37 °C med 5 % CO_2 i luftatmosfär under 48 timmar. Testkemikalieplattans utformning visas i tabell 6. Block 1–7 visar placering av ökande doser av testkemikalien.

▼M5

Tabell 6

Doseringsschema för exponeringen av H295R-celler för att testa kemikalier i en 24-hålsplatta

	1	2	3	4	5	6
A	DMSO	DMSO	DMSO	Block 4	Block 4	Block 4
B	Block 1	Block1	Block 1	Block 5	Block 5	Block 5
C	Block 2	Block 2	Block 2	Block 6	Block 6	Block 6
D	Block 3	Block 3	Block 3	Block 7	Block 7	Block 7

40. Efter 48 timmar tas exponeringsplattorna ut ur inkubatorn och varje hål kontrolleras i mikroskop avseende celltillstånd (fastsättning, morfologi, grad av konfluens) och tecken på cytotoxicitet. Mediet från varje hål delas i två lika stora mängder (cirka 490 µl vardera) och överförs till två separata rör märkta på lämpligt sätt (dvs. en alikvot för att ge ett extraprov för varje hål). För att förhindra cellerna från att torka ut, tas mediet bort en rad eller kolumn i taget och ersätts med mediet för cellviabilitets-/cytotoxicitetstestet. Om cellviabilitet/cytotoxicitet inte ska mätas direkt tillsätts 200 µl PBS med Ca^{2+} och Mg^{2+} till varje hål. Mediet fryses vid – 80 °C tills vidare bearbetning för analys av hormonkoncentrationer (se punkterna 44–46). Medan T och E2 i medium som lagras vid – 80 °C i allmänhet är stabila i minst 3 månader bör hormonstabiliteten under lagringen dokumenteras på varje laboratorium.

41. Omedelbart efter avlägsnande av mediet bestäms cellviabilitet/cytotoxicitet för varje exponeringsplatta.

Cellviabilitetsbestämning

42. Ett valfritt cellviabilitets-/cytotoxicitetstest kan användas för att bestämma den testkemikaliens potentiella effekt på cellernas livskraft. Testet bör kunna ge ett sant mått på andelen livsdugliga celler i ett hål eller det bör visas att det är direkt jämförbart med (en linjär funktion av) Live/Dead®-testet (se tillägg III till valideringsrapporten [hänvisning 4]). Ett alternativt test som har visat sig fungera lika bra är MTT [3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazoliumbromid]-testet (se hänvisning 18). Bedömningen av cellviabiliteten med hjälp av ovanstående metoder är ett relativt mått som inte nödvändigtvis uppvisar linjära samband med det totala antalet celler i ett hål. Därför bör en subjektiv parallell visuell bedömning av varje hål genomföras av analytikern och digitala bilder av lösningsmedelskontroller och de två högsta icke-cytotoxiska koncentrationerna ska tas och arkiveras för att senare kunna bedöma sann celltäthet om det skulle krävas. Om det genom visuell inspektion eller om det framgår av viabilitets-/cytotoxicitetstestet att det tycks finnas en ökning av antalet celler måste den eventuella ökningen verifieras. Om en ökning av cellantalet verifieras bör detta anges i testrapporten. Cellernas livsduglighet uttrycks i förhållande till den genomsnittliga responsen i lösningsmedelskontroller, som anses vara 100 % viabla celler och beräknas som lämpliga för det cellviabilitets-/ cytotoxicitetstest som används. För MTT- testet kan följande formel användas:

▼M5

% viabla celler = (respons i hål – genomsnittlig respons i MeOH-behandlade [= 100 % döda] hål) ÷ (genomsnittlig respons i SC-hål – genomsnittlig respons i MeOH-behandlade [= 100 % döda] hål)

43. Hål med viabilitet lägre än 80 %, i förhållande till den genomsnittliga viabiliteten i SC (= 100 % viabilitet), bör inte ingå i den slutliga dataanalysen. Inhibering av steroidogenes som uppträder i närvaro av nästan 20 % cytotoxicitet bör utvärderas noggrant för att säkerställa att cytotoxiciteten inte är orsaken till inhibitionen.

Hormonanalys

44. Varje laboratorium kan använda ett valfritt hormonmätsystem för analysen av T och E2. Restalikvoter av medium från varje behandlingsgrupp kan användas för att bereda spädningar, för att hålla koncentrationen inom den linjära delen av standardkurvan. Som anges i punkt 29, bör varje laboratorium påvisa överensstämmelsen mellan sitt hormonmätsystem (t.ex.Elisa, RIA, LC-MS, LC-MS/MS) och QC-kriterierna genom att analysera berikat medium spikat med en intern hormonkontroll innan QC-omgångarna eller testningen av kemikalierna genomförs. För att säkerställa att komponenterna i testsystemet inte stör mätningen av hormoner kan hormonerna behöva extraheras från mediet innan de mäts (se punkt 30 för de omständigheter under vilka en extraktion krävs eller ej). Det rekommenderas att man utför extraktion enligt förfarandena i tillägg III till valideringsrapporten (se hänvisning 4).

45. Om ett kommersiellt testkit används för att mäta hormonproduktionen bör hormonanalysen utföras enligt de manualer som tillhandahålls av testkittillverkaren. De flesta tillverkare har ett unikt förfarande för hur hormonanalyserna ska genomföras. Spädning av prover behöver anpassas så att förväntade hormonkoncentrationer för lösningsmedelskontroller ligger inom mitten i det linjära området för standardkurvan för det enskilda testet (tillägg III till valideringsrapporten [se hänvisning 4]). Värden utanför den linjära delen av standardkurvan bör avvisas.

46. Slutliga hormonkoncentrationer beräknas enligt följande:

Exempel:

Extraherat:	450 µl medium
Beredd i:	250 µl testbuffert
Utspädning i test:	1:10 (för att hålla provet inom det linjära området för standardkurvan)
Hormonkoncentration i test:	150 pg/ml (redan justerad till koncentration per ml prov som testas)
Återvinning:	89 %
Slutlig hormonkoncentration =	(Hormonkoncentration (per ml) ÷ återvinning) (spädningsfaktor)
Slutlig hormonkoncentration =	(150 pg/ml) ÷ (0,89) × (250 µl/450 µl) × 10 = 936,3 pg/ml

▼M5

Val av testkoncentrationer

47. Minst två oberoende omgångar av testet ska genomföras. Om det inte finns förhandsinformation, t.ex. om löslighetsgränser eller cytotoxicitet, som kan ligga till grund för valet av testkoncentrationer, rekommenderas att testkoncentrationerna för den inledande omgången fördelas med $\log_{10}$-intervaller med 10^{-3} M som den högsta koncentrationen. Om kemikalien är löslig och inte är cytotoxisk vid någon av de testade koncentrationerna och den första omgången var negativ för alla koncentrationer, ska detta bekräftas i ytterligare en omgång med samma betingelser som i den första omgången (tabell 7). Om resultaten från den första omgången är *tvetydiga* (dvs. den X-faldiga förändringen är statistiskt signifikant från SC vid endast en koncentration) eller positiva (dvs. den X-faldiga förändringen för två eller flera intilliggande koncentrationer är statistiskt säkerställd), ska testet upprepas enligt tabell 7 genom förfining av de valda testkoncentrationerna. Testkoncentrationerna i omgång två och tre (i förekommande fall) ska justeras på grundval av resultaten från den inledande omgången, och intervallet ska inkludera de koncentrationer som gav en effekt varvid en 1/2-log koncentrationsfördelning används (t.ex. om den ursprungliga omgången på 0,001 – 0,01 – 0,1 – 1 – 10 – 100 – 1 000 μM resulterade i induktioner vid 1 och 10 μM, bör de koncentrationer som testas i den andra omgången vara 0,1 – 0,3 – 1 – 3 – 10 – 30 – 100 μM), såvida inte lägre koncentrationer måste användas för att fastställa ett LOEC-värde. I det senare fallet bör åtminstone fem koncentrationer under den lägsta testade koncentrationen i den första omgången ingå i den andra omgången, med användning av en 1/2-logskala. Om den andra omgången inte bekräftar den första omgången (dvs.statistisk signifikans inträffar inte vid den tidigare positivt testade koncentrationen ± 1 koncentrationsökning), ska ett tredje försök utföras under de ursprungliga testbetingelserna. Tvetydiga resultat i den första omgången betraktas som negativa om den observerade effekten inte kunde bekräftas i någon av de två efterföljande omgångarna. Tvetydiga resultat betraktas som positiva responser (effekt) när svaret kan bekräftas i ytterligare minst en omgång med en koncentrationsökning inom ± 1 (se avsnitt 55 beträffande datatolkning).

Tabell 7

Beslutsmatris för möjliga utfallsscenarier

Omgång 1	Omgång 2		Omgång 3		Beslut	
Scenario	Beslut	Scenario	Beslut	Scenario	Positiv	Negativ
Negativ	Bekräfta ([a])	Negativ	Stoppa			X
Negativ	Bekräfta ([a])	Positiv	Förfina ([b])	Negativ		X
Tvetydig ([c])	Förfina ([b])	Negativ	Bekräfta ([a])	Negativ		X
Tvetydig ([c])	Förfina ([b])	Negativ	Bekräfta ([a])	Positiv	X	
Tvetydig ([c])	Förfina ([b])	Positiv			X	
Positiv	Förfina ([b])	Negativ	Bekräfta ([a])	Positiv	X	

▼M5

Omgång 1	Omgång 2		Omgång 3		Beslut	
Scenario	Beslut	Scenario	Beslut	Scenario	Positiv	Negativ
Negativ	Bekräfta ([a])	Positiv	Förfina ([b])	Positiv	X	
Positiv	Förfina ([b])	Positiv	Stoppa		X	

([a]) Bekräfta tidigare omgång med användning av samma experimentella upplägg.
([b]) Ny testomgång med 1/2-log koncentrationsindelning (med ett intervall som inkluderar den koncentration som testades signifikant annorlunda i föregående experiment).
([c]) X-faldig förändring vid en koncentration är statistiskt signifikant annorlunda jämfört med SC.

Kvalitetskontroll av testplattan

48. Förutom att uppfylla kriterierna för QC-plattan bör andra kvalitetskriterier som gäller för acceptabel variation mellan likadana hål, replikatexperiment, linjäritet och känslighet hos hormonmätsystem, variation mellan replikata hormonmätningar för samma prov samt procentuella utbyte av hormontoppar efter extraktion av medium (om tillämpligt, se punkt 30 om extraktionskrav) uppfyllas, och de anges i tabell 8. Data bör falla inom acceptabla gränser som definierats för varje parameter som ska beaktas för vidare utvärdering. Om dessa kriterier inte uppfylls, ska det på kalkylbladet noteras att QC-kriterierna inte uppfylldes för provet i fråga och provet ska analyseras på nytt eller tas bort från datamängden.

Tabell 8

Acceptabla områden och/eller variationer (%) för H295R-testplattans parametrar

(*LOQ*: kvantifieringsgränsen för hormonmätsystemet. CV: Variationskoefficient. SC: Lösningsmedelskontroll. DPM: Sönderfall per minut)

	Jämförelse mellan	T	E2
Basal hormonproduktion i SC	X-faldig högre än LOQ	≥ 5-faldig	≥ 2,5-faldig
Exponeringsexperiment – inom plattans CV för SC (replikathål)	Absoluta koncentrationer	≤ 30 %	≤ 30 %
Exponeringsexperiment – inom plattans CV för SC (replikathål)	X-faldig förändring	≤ 30 %	≤ 30 %
Hormonmätsystem – känslighet	Detekterbar X-faldig minskning i förhållande till SC	≥ 5-faldig	≥ 2,5-faldig
Hormonmätsystem – replikata mätningar CV för SC ([a])	Absoluta koncentrationer	≤ 25 %	≤ 25 %
Mediumextraktion – återvinning av intern 3H-standard (om tillämpligt)	DPM	≥ 65 % nominell	

([a]) Avser replikata mätningar för samma prov.

▼M5

DATAANALYS OCH RAPPORTERING

Dataanalys

49. För att utvärdera den relativa ökningen/minskningen av en kemiskt förändrad hormonproduktion, bör resultaten normaliseras mot medelvärdet av SC-värdet för varje testplatta och resultaten bör uttryckas som förändringar i förhållande till SC för varje testplatta. All data är ska uttryckas som medelvärde ± 1 standardavvikelse (SD).

50. Endast hormondata från hål där cytotoxiciteten var mindre än 20 % bör ingå i dataanalysen. Relativa förändringar bör beräknas på följande sätt:

Relativ förändring = (hormonkoncentration i varje hål) ÷ (medelvärde för hormonkoncentration i alla lösningsmedelskontrollhål).

51. Om en visuell inspektion av hålet eller det viabilitets-/ cytotoxicitetstest som beskrivs i punkt 42 tyder på en ökning av antalet celler, måste den eventuella ökningen verifieras. Om en ökning av cellantalet verifieras bör detta anges i testrapporten.

52. Innan statistiska analyser genomförs, bör antaganden om normalitet och varianshomogenitet utvärderas. Normalitet bör utvärderas med hjälp av standardsannolikhetsplotter eller annan lämplig statistisk metod (t.ex.Shapiro-Wilks-test). Om data (X-faldig förändring) inte är normalfördelade bör man pröva att transformera data för att approximera en normalfördelning. Om data är normalfördelade, eller approximerar en normalfördelning, bör skillnaderna mellan kemiska koncentrationsgrupper och SC analyseras med hjälp av ett parametriskt test (t.ex.Dunnetts test) med *koncentration* som den oberoende och *respons* (X-faldig förändring) som den beroende variabeln. Om data inte är normalfördelade bör ett lämpligt icke-parametriskt test användas (t.ex.Kruskal Wallis, Steel's Many-one rank test). Skillnaderna anses signifikanta vid $p \leq 0{,}05$. Statistiska utvärderingar görs baserade på medelvärden för varje hål som representerar oberoende replikata datapunkter. Det förväntas att, på grund av det stora mellanrummet mellan doserna i den första omgången ($\log_{10}$-skala), det i många fall inte kommer att vara möjligt att beskriva tydliga koncentration-respons-samband där de två största doserna kommer att vara i den linjära delen av sigmoidkurvan. Därför kommer, för den första omgången eller andra datauppsättningar där detta inträffar (t.ex.där ingen maximal effekt kan uppskattas), fast rörlig statistik av typ I enligt ovan att tillämpas.

53. Om fler än två datapunkter ligger på den linjära delen av kurvan och där maximal verkningsgrad kan beräknas – som förutses för några av de andra omgångarna som utförs med hjälp av ett semi-log avstånd mellan exponeringskoncentrationer – bör en probit-, logit- eller annan lämplig regressionsmodell användas för att beräkna effektiva koncentrationer (t.ex.EC50 och EC20).

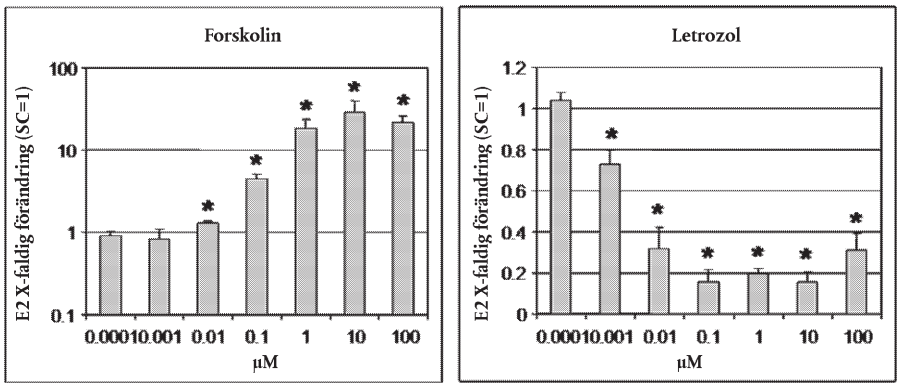
54. Resultaten bör ges både i grafiskt format (stapeldiagram som representerar medelvärdet ± 1 SD) och i tabellform (LOEC/NOEC, effektriktning och styrka för maximal respons som är en del av dos-responsdelen för data) (se figur 3 för ett exempel). Databedömning anses endast giltig om den har baserats på minst två oberoende genomförda omgångar. Försök eller omgångar anses vara oberoende om de har genomförts på en annan dag med en ny uppsättning lösningar och kontroller. Det koncentrationsintervall som används i försök 2 och 3 (om det behövs) kan skräddarsys utifrån resultaten från försök 1 för att bättre definiera dos-responsområdet som innehåller LOEC (se punkt 47).

▼M5

Figur 3

Exempel på presentation och utvärdering av data som erhållits under genomförandet av H295R-testet i grafisk form och i tabellform

(Asterisker indikerar statistiskt signifikanta skillnader jämfört med lösningsmedelskontrollen ($p < 0,05$). LOEC: lägsta koncentration med observerad effekt. Maxförändring: maximal styrka hos responsen observerad vid någon koncentration i förhållande till den genomsnittliga SC-responsen (= 1))



Kemikalie	LOEC	Maxförändring
Forskolin	0,01	0,15-faldig
Letrozol	0,001	29-faldig

Datatolkning

55. En testkemikalie bedöms vara positiv om den X-faldiga induktionen är statistiskt skild ($p \leq 0,05$) från lösningsmedelskontrollen vid två intilliggande koncentrationer i åtminstone två oberoende försök (tabell 7). En testkemikalie bedöms vara negativ efter två oberoende negativa försök, eller i tre försök, som består av två negativa försök och en tvetydig eller ett positiv försök. Om de data som genereras i tre oberoende försök inte uppfyller de beslutskriterier som anges i tabell 7, är de experimentella resultaten inte tolkningsbara. Resultat från koncentrationer som överstiger gränserna för löslighet eller vid cytotoxiska koncentrationer bör inte ingå i tolkningen av resultaten.

Testrapport

56. Testrapporten ska innehålla följande information:

Testanläggning

— Namn på anläggning och adress.

— Försöksledaren och annan personal samt deras studieansvar.

— Datum då studien började och slutade.

▼**M5**

Testkemikalie, reagens och kontroller

— Identitet (namn/CAS-nr i förekommande fall), ursprung, partinummer, renhet, leverantör och karakterisering av testkemikalien, reagens och kontroller.

— Testkemikaliens fysikaliska form och relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper.

— Förvaringsförhållanden samt metoden och frekvensen för beredningen av testkemikalier, reagenser och kontroller.

— Testkemikaliens stabilitet.

Celler

— Ursprung och celltyper.

— Antalet cellpassager (cellpassageidentifikator) för celler som används i testet.

— Beskrivning av förfarandena för underhåll av cellkulturer.

Förundersökningskrav (om tillämpligt)

— Beskrivning av och resultat från den kemiska hormoninterferenstest.

— Beskrivning av och resultat från mätningar av hormonextraktionseffektivitet.

— Standard- och kalibreringskurvor för alla analystester som ska genomföras.

— Detektionsgränser för de valda analystesterna.

Testbetingelser

— Mediets sammansättning.

— Testkemikaliens koncentration.

— Celldensitet (beräknade eller uppmätta cellkoncentrationer vid 24 timmar och 48 timmar).

— Testkemikaliens löslighet (löslighetsgräns, om fastställd).

— Inkubationstid och villkor.

Testresultat

— Rådata för varje hål för kontroller och testkemikalier – varje mätresultat från replikat i form av de ursprungliga uppgifterna från det instrument som används för att mäta hormonproduktion (t.ex.OD, fluorescensenheter, DPM, etc.).

— Validering av normalitet eller beskrivning av datatransformation.

— Responsmedelvärde ± 1 SD för varje hål som mätts.

— Cytotoxicitetsdata (testkoncentrationer som orsakade cytotoxicitet).

— Bekräftelse på att QC-kraven uppfylldes.

▼M5

— Relativ förändring jämfört med lösningsmedelskontroll korrigerad för cytotoxicitet.

— Ett stapeldiagram som visar relativ (X-faldig förändring) vid varje koncentration, SD och statistisk signifikans som anges i punkt 49–54.

Tolkning av data

— Tillämpa datatolkningsförfarandet på resultaten och diskutera iakttagelser.

Diskussion

— Finns det några indikationer i studien beträffande möjligheten att T/E2-data kan påverkas av indirekta effekter på gluko- och mineral-kortikosteroidbindande vägar?

Slutsatser

LITTERATUR

1. OECD (2002), OECD Conceptual Framework for the Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals, se tillägg 2 till kapitel B.54 i denna bilaga.

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/MONO(2010)31, Paris. Finns 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. Finns 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, finns 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. och 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. och 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. och 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**

10. Higley, E.B., Newsted, J.L., Zhang, X., Giesy, J.P. och 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. och 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. och 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. och 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. och 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. och 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 denna bilaga: Hershbergers bioassay på råtta: Ett korttidsscreeningtest för (anti)androgena egenskaper.

17. Shapiro, R. och 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

Tillägg

DEFINITIONER

Konfluens: avser täckningen eller spridningen för att cellerna tillåts över eller under hela odlingsmediet.

Kemikalie: ett ämne eller en blandning.

CV: avser variationskoefficienten, och definieras som kvoten mellan standardavvikelsen för en distribution till sitt aritmetiska medelvärde.

CYP: står för cytokrom P450 monooxygenaser, en familj av gener och enzymer som framställs från de som är involverade i katalysering av ett stort antal biokemiska reaktioner, inklusive syntes och metabolism av steroidhormoner.

DPM: sönderfall per minut. Det är antalet atomer i en given mängd radioaktivt material som upptäcks ha avklingat under en minut.

E2: 17β-östradiol, det viktigaste östrogenet hos däggdjur.

H295R-celler: humana adreno-karcinomceller som har fysiologiska egenskaper som zonalt odifferentierade humana fetala adrenala celler och som uttrycker alla enzymer i steroidogenesens syntesväg. De är tillgängliga genom ATCC.

Frysmedium: används för att frysa och lagra frysta celler. Det består av lagermedium samt BD NuSerum och dimetylsulfoxid.

Linjärt område: det område inom den standardkurva för ett hormonmätsystem där resultaten är proportionella mot koncentrationen av analyten i provet.

LOQ: står för *kvantifieringsgränsen*, och är den lägsta mängd av en kemikalie som kan särskiljas från avsaknaden av denna kemikalie (ett tomt värde) inom ett angivet konfidensintervall. Vid tillämpning av denna metod definieras LOQ typiskt av tillverkaren av testsystemen, om inte annat anges.

LOEC: lägsta koncentration med observerad effekt, den lägsta koncentrationsnivå vid vilken testsvaret är statistiskt skilt från det för lösningsmedelskontrollen.

NOEC: nolleffektkoncentrationen, som är den högsta koncentration som testats om testet inte ger ett positivt svar.

Passage: det antal gånger som cellerna uppdelas efter initiering av en kultur från fryst lager. Den inledande passagen som startades från det frysta lagret tilldelas nummer ett (1). Celler som delats 1 gång märks passage 2 etc.

PBS: Dulbeccos fosfatbuffrade saltlösning.

Kvalitetskontroll: förkortat QC, avser de mått som behövs för att säkerställa giltiga data.

Kvalitetskontrollplatta: en 24-hålsplatta innehållande två koncentrationer av de positiva och negativa kontrollerna för att övervaka prestandan hos en ny sats celler, eller för att tillhandahålla positiva kontroller för testet vid testning av kemikalier.

Omgång: ett oberoende experiment som kännetecknas av en ny uppsättning av lösningar och kontroller.

▼M5

Lagermedium: basen för beredning av andra reagenser. Den består av en 1:1-blandning av Dulbecco's Modified Eagle's Medium och Ham's F-12 Nutrient mixture (DMEM/F12) i 15 mM HEPES-buffert utan fenolrött eller natriumbikarbonat. Natriumbikarbonat tillsätts som bufferten, se tillägg II till valideringsrapporten (se hänvisning 4).

Berikat medium: består av lagermedium samt BD Nu-Serum och ITS+ premiummix, se tillägg II till valideringsrapporten (se hänvisning 4).

Steroidogenes: den syntetiska reaktionsvägen som leder från kolesterol till de olika steroidhormonerna. Flera mellanprodukter i steroidsyntesvägen, såsom progesteron och testosteron, är viktiga hormoner i sig själva, men fungerar också som föregångare till hormoner senare i syntesvägen.

T: står för testosteron, en av de två viktigaste androgenerna hos däggdjur.

Testkemikalie: varje ämne eller blandning som testas med denna testmetod.

Testplatta: den platta på vilken H295R-cellerna exponeras för testkemikalien. Testplattor innehåller lösningsmedelskontrollen och testkemikalien vid sju koncentrationer i tre replikat.

Trypsin 1X: en utspädd lösning av enzymet trypsin, ett pankreatiskt serinproteas, som används för att lossa celler från en cellodlingsplatta, se tillägg III till valideringsrapporten (se hänvisning 4).

▼M5

B.58 GENMUTATIONSTESTER I SOMATISKA CELLER OCH KÖNSCELLER HOS TRANSGENA GNAGARE

INLEDNING

1. Denna testmetod motsvarar OECD:s testriktlinje (TG) 488 (2013). EU-testmetoder finns tillgängliga för ett brett spektrum av *in vitro*-mutationstester som kan detektera kromosom- och/eller genmutationer. Det finns testmetoder för *in vivo*-endpoints (dvs. kromosomförändringar och ej planenlig DNA-syntes) men dessa mäter inte genmutationer. Mutationstester med transgena gnagare (TGR) uppfyller behovet av praktiska och allmänt tillgängliga *in vivo*-tester avseende genmutationer.

2. TGR-mutationstesterna har granskats utförligt (se hänvisning 24, 33). De använder transgena råttor och möss som innehåller flera kopior av kromosomalt integrerad plasmid- eller fagskyttelvektorer. Transgenerna innehåller reportergener för påvisande av olika typer av mutationer inducerade *in vivo* av testkemikalier.

3. Mutationer som uppstår hos en gnagare bedöms genom återvinning av transgenen och analys av reportergenens fenotyp i en värdbakterie som saknar reportergenen. TGR-genmutationstester mäter mutationer som induceras i genetiskt neutrala gener återvunna från praktiskt taget alla vävnader hos gnagare. Dessa tester kringgår därför många av de befintliga begränsningarna i samband med studier av *in vivo*-genmutation i endogena gener (t.ex. begränsade vävnader som är lämpliga för analys, negativ/positiv selektion mot mutationer).

4. Den sammanvägda bedömningen tyder på att transgener svarar på mutagena ämnen på ett liknande sätt som endogena gener, särskilt när det gäller att upptäcka basparssubstitutioner, frameshift-mutationer och små deletioner och insertioner (se hänvisning 24).

5. De internationella seminarierna om genotoxicitetstestning (IWGT) har ställt sig bakom införandet av TGR-genmutationstester för *in vivo*-detektion av genmutationer, och har rekommenderat ett protokoll för deras genomförande (se hänvisning 15, 29). Denna testmetod baseras på dessa rekommendationer. Ytterligare analys som stöder användningen av detta protokoll finns i (se hänvisning 16).

6. I framtiden väntas det bli möjligt att kombinera ett TGR-genmutationstest med en toxikologisk studie med upprepad dosering (kapitel B.7 i denna bilaga). Men data som krävs för att säkerställa att känsligheten i TGR-genmutationstester inte påverkas av den kortare period (en dag) mellan administreringsperiodens slut och provtagningstiden som används i det toxikologiska testet med upprepad dosering, jämfört med de tre dagar som används i TGR-genmutationstester. Data krävs också för att visa att prestandan hos analysen med upprepad dosering inte påverkas negativt av att använda en transgen gnagarstam snarare än traditionella gnagarstammar. När dessa uppgifter är tillgängliga kommer denna testmetod att uppdateras.

7. Definitioner av centrala begrepp anges i tillägget.

▼M5

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN

8. TGR-genmutationstester för vilka det finns tillräckliga data för att stödja användning i denna testmetod är: *lacZ* bakteriofag-mus (Muta™Mouse), *lacZ* plasmid-mus, *gpt*-delta (*gpt* och Spi$^-$)-mus och -råtta, *lacI*-mus och -råtta (Big Blue®), som utförs under standardbetingelser. Dessutom kandetpositiva selektionstestet *cII* användas för att utvärdera mutationer i Big Blue® och MutaäMouse-modeller. Mutagenes i TGR-modellerna bedöms normalt som mutantfrekvens om så krävs, dock kan molekylär analys av mutationer ge ytterligare information (se punkt 24).

9. Dessa *in vivo*-genmutationstest på gnagare är särskilt relevanta för att fastställa mutagena risker, eftersom testernas responser är beroende av *in vivo*-metabolism, farmakokinetik, DNA-reparationsprocesser och DNA-translesionssyntes, även om dessa kan variera mellan olika arter, olika vävnader och olika typer av DNA-skador. Ett *in vivo*-test för genmutationer är användbart för fortsatta undersökningar av en mutagen effekt detekterat av ett *in vitro*-system, och för att följa upp resultaten från tester med andra *in vivo*-endpoints (se hänvisning 24). Förutom att vara kausalt förknippad med framkallandet av cancer, är genmutation en relevant endpoint för förutsägelsen av mutationsbaserade icke-cancerogena sjukdomar i somatiska vävnader (se hänvisning 12, 13) samt sjukdomar som överförs via könsceller.

10. Om det finns bevis för att testkemikalien eller en relevant metabolit inte kommer att nå några av de aktuella vävnaderna, är det inte lämpligt att utföra ett TGR-genmutationstest.

PRINCIP FÖR TESTMETODEN

11. I de tester som beskrivs i punkt 8 är målgenen av bakteriellt eller bakteriofagt ursprung, och metoden för återvinning av genomiskt DNA från gnagare är via införlivande av transgenen in i en λ bakteriofag- eller plasmid-skyttelvektor. Proceduren involverar extraktion av genomiskt DNA från gnagarvävnaden, *in vitro*-bearbetning av det genomiska DNA:t (dvs. packning av λ-vektorer eller ligering och elektroporering av plasmider för att återvinna skyttelvektorn) och efterföljande detektion av mutationer i bakterievärdar under lämpliga förhållanden. Testerna använder neutrala transgener som lätt kan återvinnas ur de flesta vävnader.

12. Det grundläggande TGR-genmutationsexperimentet innebär behandling av gnagare med en kemikalie under en tidsperiod. Kemikalien kan administreras på varje sätt som är lämpligt, inklusive genom implantation (t.ex. medicinteknisk provning). Den totala tiden under vilken ett djur doseras kallas administreringsperioden. Administration följs vanligen av en period före avlivning då kemikalien inte administreras och då orepparerade DNA-skador fixeras till stabila mutationer. I litteraturen har denna period omväxlande kallats för manifestationstid, fixeringstid eller uttryckstid, och slutet av denna period är provtagningstiden (se hänvisning 15, 29). Då djuret har avlivats, isoleras genomiskt DNA från de berörda vävnaderna och renas.

▼M5

13. Data för en enstaka vävnad per djur från flera packningar/ligeringar är vanligtvis aggregerade och mutantfrekvensen utvärderas generellt med hjälp av sammanlagt mellan 10^5 och 10^7 plackbildande eller kolonibildande enheter. Vid användning av positiva selektionsmetoder bestäms de totala plackbildande enheterna med en separat uppsättning icke-selektiva plattor.

14. Positiva selektionsmetoder har utvecklats för att underlätta påvisande av mutationer i både *gpt*-genen(*gpt*-deltamus och -råtta, *gpt*$^-$-fenotypen [se hänvisning 20, 22, 28]) och *lacZ*-genen (Muta™Mouse eller *lacZ*-plasmidmus [se hänvisning 3, 10, 11, 30]). *lacI*-genmutationer hos Big Blue®-djur påvisas däremot med en icke-selektiv metod som identifierar mutanter genom bildning av färgad (blå) plack. Positiva selektionsmetoder används också för att påvisa punktmutationer som uppstår i *cII*-genen hos λ-bakteriofagskyttelvektorn (Big Blue®-mus eller -råtta, och Muta™Mouse [se hänvisning 17]) och deletionsmutationer i λ *red*- och *gam*-generna (Spi$^-$-val i *gpt*-deltamus och -råtta [se hänvisning 21, 22, 28]). Mutantfrekvens beräknas genom att antalet plack/plasmider som innehåller mutationer i transgenen divideras med det totala antalet utvunna plack/plasmider från samma DNA-prov. I TGR-genmutationsstudier är mutantfrekvensen den rapporterade parametern. Dessutom kan en mutationsfrekvens bestämmas som den fraktion av celler som bär oberoende mutationer. Denna beräkning kräver korrigering för klonal expansion genom sekvensering av de utvunna mutanterna (se hänvisning 24).

15. De mutationer som bedöms i *lacI-, lacZ-, cII-* och *gpt*-punktmutationstesterna består främst av basparssubstitutioner, frameshift-mutationer och små insertioner/deletioner. Den relativa andelen av dessa mutationstyper bland spontana mutationer liknar den som ses i den endogena *HPRT*-genen. Stora deletioner påvisas endast med Spi$^-$-selektionsanalys och *lacZ*-plasmidtester (se hänvisning 24). Mutationer av intresse är *in vivo*-mutationer som uppstår hos mus eller råtta. *In vitro*- och *ex vivo*-mutationer, som kan uppstå under fag-/plasmidåtervinning, replikation eller reparation, är relativt sällsynta och kan i vissa system identifieras specifikt, eller uteslutas av systemet med bakterievärd/positiv selektion.

BESKRIVNING AV METODEN

Förberedelser

Val av djurart

16. En mängd olika transgena genmutationsdetektionsmodeller för möss är tillgängliga och dessa system har i större utsträckning än transgena råttmodeller. Om råttan är en mer lämplig modell än musen (t.ex. när man undersöker mekanismen för carcinogenes för en tumör som endast ses hos råttor, för att korrelera med en toxicitetsstudie för råtta eller om råttmetabolism är känd för att vara mer representativ för människans ämnesomsättning) bör man överväga att använda transgena råttmodeller.

Inhysnings- och utfodringsförhållanden

17. Den ideala temperaturen i djurutrymmet är 22 °C (± 3 °C). Den relativa fuktigheten bör vara minst 30 % och ska helst inte överstiga 70 % utom när rummet rengörs, målet är att upprätthålla en relativ luftfuktighet på 50–60 %. Belysningen bör vara artificiell, med en daglig sekvens på 12

▼M5

timmars ljus, följt av 12 timmars mörker. För utfodring kan konventionellt laboratoriefoder användas med fri tillgång till dricksvatten. Valet av foder kan påverkas av behovet av att säkerställa en lämplig blandning av en testkemikalie när den administreras via fodret. Djur bör hållas i små grupper (högst fem) av samma kön, om inget aggressivt beteende kan förväntas. Djuren får hållas individuellt om det är vetenskapligt motiverat.

Förberedelse av djuren

18. Friska, unga, sexuellt mogna vuxna djur (8–12 veckor gamla vid behandlingsstarten) väljs slumpvis ut till kontroll- och behandlingsgrupperna. Djuren ska ha en unik identifiering. De bör vänjas vid förhållandena i laboratoriet under minst fem dagar. Burarna bör placeras så att eventuella effekter beroende på deras placering blir så små som möjligt. Vid studiens början bör viktskillnaderna mellan försöksdjuren vara minimal och inte överskrida ± 20 % av medelvikten för varje kön.

Beredning av doser

19. Fasta testkemikalier bör lösas upp eller suspenderas i lämpliga lösningsmedel eller vehiklar eller blandas i foder eller dricksvatten innan dosen administreras till djuren. Testkemikalier i flytande form kan doseras direkt eller spädas ut före doseringen. Vid inhalationsexponering kan testkemikalier administreras som gas, ånga eller en fast/flytande aerosol, beroende på deras fysikalisk-kemiska egenskaper. Nygjorda beredningar av testkemikalien bör användas om inte stabilitetsdata visar att lagringen är acceptabel.

Testbetingelser

Lösningsmedel/vehikel

20. Lösningsmedlet/vehikeln bör inte ge upphov till toxiska effekter vid de dosnivåer som används och bör inte kunna misstänkas för att reagera kemiskt med testkemikalien. Om annat än välkända lösningsmedel/vehiklar används bör detta stödjas med referensdata som visar deras kompatibilitet. Det rekommenderas att i första hand använda vattenbaserade lösningsmedel/vehiklar, om det är möjligt.

Positiva kontroller

21. Jämsides behandlade positiva kontrolldjur bör normalt användas. För laboratorier som har visat kompetens (se punkt 23) och rutinmässigt använder dessa analyser kan dock DNA från djur som i tidigare experiment behandlats som positiv kontroll ingå i varje studie för att bekräfta metodens framgång. Sådant DNA från tidigare experiment bör erhållas från samma art och vävnader av intresse, och bör förvaras på rätt sätt (se punkt 36). När jämsides behandlade positiva kontroller används, är det inte nödvändigt att administrera dem genom samma väg som testkemikalien, men de positiva kontrollerna bör vara kända för att framkalla mutationer i en eller flera vävnader genom testkemikalien. Doserna med de positiva kontrollkemikalierna bör väljas så att de ger svaga eller måttliga effekter som kritiskt bedömer resultaten och testets känslighet. Exempel på positiva kontrollkemikalier och vissa av deras målvävnader finns i tabell 1.

▼M5

Tabell 1

Exempel på positiva kontrollkemikalier och vissa av deras målvävnader

Positiv kontrollkemikalie och CAS-nr	Einecs-namn och Einecs-nr	Egenskaper	Mutationsmålvävnaden	
			Råtta	Mus
N-etyl-N-nitrosourea [CAS-nr 759-73-9]	N-etyl-N-nitrosourea [212-072-2]	Direktverkande mutagen	Lever, lunga	Benmärg, kolon, kolonepitel, tarm, lever, lunga, mjälte, njure, ovariala granulosa celler, hanliga könsceller
Etylkarbamat (uretan) [CAS-nr 51-79-6]	Uretan [200-123-1]	Mutagen, kräver metabolism men producerar bara svaga effekter		Benmärg, förmage, tunntarm, lever, lunga, mjälte
2,4-diaminotoluen [CAS-nr 95-80-7]	4-metyl-m-fenylen-diamin [202-453-1]	Mutagen, kräver metabolism, även positiv i Spi⁻-testet	Lever	Lever
Benso[a]pyren [CAS-nr 50-32-8]	Benso[def]krysen [200-028-5]	Mutagen, kräver metabolism	Lever, bukhinnenät,	Benmärg, bröst, kolon, förmage, körtelmage, hjärta, lever, lunga, hanliga könsceller

Negativa kontroller

22. Negativa kontroller, behandlade med lösningsmedel eller endast vehikel, och i övrigt behandlade på samma sätt som behandlingsgrupperna, bör inkluderas för varje provtagningstillfälle. I avsaknad av historiska eller publicerade kontrolldata som visar att inga skadliga eller mutagena effekter induceras av det valda lösningsmedlet/vehikeln, bör obehandlade kontroller också inkluderas för varje provtagningstillfälle, för att fastställa acceptansen för vehikelkontrollen.

Kvalifikationsprövning av laboratorium

23. Laboratoriets kompetens att utföra dessa tester bör fastställas genom demonstration av förmågan att reproducera förväntade resultat från publicerade data (se hänvisning 24) för 1) mutantfrekvenser med positiva kontrollkemikalier (inklusive svaga responser) såsom de som anges i tabell 1, icke-mutagener, och vehikelkontroller samt 2) transgen återhämtning från genomiskt DNA (t.ex. packningseffektivitet).

Sekvensering av mutanter

24. För regleringstillämpningar är DNA-sekvensering av mutanter inte nödvändigt, i synnerhet där ett tydligt positivt eller negativt resultat erhålls. Dock kan sekvensdata vara användbara när hög interindividuell variation observeras. I dessa fall kan sekvensering användas för att utesluta möjligheten av jackpot eller klonala händelser, genom att identifiera andelen unika mutanter från en viss vävnad. Sekvensering av cirka 10 mutanter per vävnad per djur bör vara tillräckligt för att enkelt bestämma om klonala mutanter bidrar till mutantfrekvensen, sekvensering av så många som 25 mutanter kan vara

▼M5

nödvändig för att korrigera mutantfrekvensen matematiskt avseende klonalitet. Sekvensering av mutanter kan också övervägas när små ökningar i mutantfrekvens (dvs. som precis överskrider de obehandlade kontrollvärdena) upptäcks. Skillnader i mutantspektrum mellan de mutanta kolonierna från behandlade och obehandlade djur kan ge stöd för en mutagen effekt (se hänvisning 29). Dessutom kan mutationsspektrum vara användbara för att utveckla hypoteser om mekanism. När sekvensering ska ingå som en del av studieprotokollet bör särskild försiktighet iakttas vid utformningen av sådana studier, särskilt med avseende på antal mutanter som sekvenseras per prov, för att uppnå tillräcklig effekt enligt den statistiska modell som används (se punkt 43).

FÖRFARANDE

Djurens antal och kön

25. Antalet djur per grupp bör förutbestämmas så att det är tillräckligt för att ge den statistiska effekt som krävs för att upptäcka åtminstone en fördubbling i mutationsfrekvensen. Gruppstorlekarna bör vara på minst fem djur, men om den statistiska effekten är otillräcklig bör antalet djur ökas efter behov. Handjur bör normalt användas. Det kan finnas fall där enbart test av honor är motiverat, t.ex. vid provning av humana kvinnospecifika läkemedel eller vid utredning av specifikt kvinnlig metabolism. Om det finns betydande skillnader mellan könen i fråga om toxicitet eller ämnesomsättning måste både hanar och honor användas.

Administreringsperiod

26. Baserat på observationer att mutationer ackumuleras för varje behandling krävs upprepad dosering med dagliga behandlingar under en period av 28 dagar. Detta anses allmänt acceptabelt, både för att producera en tillräcklig ansamling av mutationer av svaga mutagener och för att ge en tillräcklig exponeringstid för att upptäcka mutationer i långsamt tillväxande organ. Alternativa behandlingsregimer kan vara lämpliga för vissa utvärderingar, och dessa alternativa doseringsscheman bör vara vetenskapligt motiverade i protokollet. Behandlingar bör inte vara kortare än den tid som krävs för fullständig induktion av alla relevanta metaboliserande enzymer, och kortare behandlingar kan göra det nödvändigt att ha flera olika provtagningstidpunkter som är lämpliga för organ med olika förökningshastigheter. I varje fall bör all tillgänglig information (t.ex. om allmän toxicitet eller metabolism och farmakokinetik) användas för att motivera ett protokoll, speciellt vid avvikelser från ovanstående standardrekommendationer. Även om det kan öka känsligheten bör behandlingstider längre än 8 veckor förklaras tydligt och motiveras, eftersom långa behandlingstider kan ge en påtaglig ökning i mutationsfrekvensen genom klonal expansion (se hänvisning 29).

Dosnivåer

27. Dosnivåerna bör baseras på resultaten från en dosfinnande studie som mäter allmän toxicitet och som genomförts med samma exponeringsväg, eller på resultaten från befintliga subakuta toxicitetsstudier. Icke-transgena djur av samma gnagarstam kan användas för bestämning av dosintervall. I huvudtestet, för att få dosresponsinformation, bör en fullständig undersökning inkludera en negativ kontrollgrupp (se punkt 22) och minst tre, lämpligt fördelade dosnivåer, utom när gränsdosen har använts (se punkt 28). Den högsta dosen bör vara maximal tolererbar dos (MTD). Den högsta dosen definieras som den dos som framkallar tecken på toxicitet på ett sådant sätt

▼M5

att högre dosnivåer, baserade på en likadan doseringsregim, förväntas leda till dödsfall. Kemikalier med specifika biologiska verkningar vid låga icketoxiska doser (såsom hormoner och mitogena substanser) och kemikalier som uppvisar mättnad av toxikokinetiska egenskaper kan vara undantag från kriterierna för dosbestämning och bör utvärderas från fall till fall. Dessa dosnivåer bör täcka in ett intervall som sträcker sig från maximal till låg eller ingen toxicitet.

Gräns för högsta dos vid testning

28. Om dosfinnande experiment eller befintliga data från besläktade gnagarstammar tyder på att en behandlingsregim med minst gränsdosen (se nedan) inte ger några observerbara toxiska effekter, och om ingen genotoxicitet förväntas baserat på data från strukturellt besläktade kemikalier, anses det inte nödvändigt med ett fullständigt test med tre dosnivåer. För en administreringsperiod på 28 dagar (dvs. 28 dagliga behandlingar), ligger gränsdosen på 1 000 mg/kg kroppsvikt/dag. För administreringsperioder på 14 dagar eller mindre, ligger gränsdosen på 2 000 mg/kg/kroppsvikt/dag (doseringsscheman som skiljer sig från 28 dagliga behandlingar bör vara vetenskapligt motiverade i protokollet, se punkt 26).

Administrering av doser

29. Testkemikalien administreras vanligtvis via sondmatning genom en magsond eller en lämplig intubationskanyl. I allmänhet bör den förväntade exponeringsvägen för människor beaktas vid utformningen av ett test. Därför kan andra exponeringsvägar (t.ex. dricksvatten, subkutant, intravenöst, topiskt, inhalation, intratrakealt, foder eller implantation) vara acceptabla där de kan motiveras. Intraperitoneal injektion rekommenderas inte eftersom den inte är en fysiologiskt relevant exponeringsväg för människor. Den maximala vätskevolymen som kan administreras genom sondmatning eller injektion vid ett tillfälle beror på försöksdjurets storlek. Volymen bör inte överskrida 2 ml/100 g kroppsvikt. Användning av större volymer än så bör motiveras. Med undantag för irriterande eller frätande kemikalier, som normalt kommer att visa stegrade verkningar vid högre koncentrationer, bör variationer av testvolymen minimeras genom justering av koncentrationen för att säkerställa en konstant volym vid alla dosnivåer.

Provtagningstid

Somatiska celler

30. Provtagningstiden är en viktig variabel eftersom den bestäms av den period som krävs för att mutationer ska fixeras. Denna period är vävnadsspecifik och förefaller vara relaterad till cellpopulationens omsättningstid, där benmärg och tarm ger en snabb respons och levern en mycket långsammare. En lämplig kompromiss för mätning av mutantfrekvenser på både snabbt och långsamt växande vävnader är dagliga behandlingar under 28 dagar i följd (såsom anges i punkt 26) och provtagning tre dagar efter den sista behandlingen, även om den maximala mutantfrekvensen kanske inte visar sig i långsamt växande vävnader under dessa förhållanden. Om långsamt växande vävnader är av särskild betydelse, kan en senare provtagningstid på 28 dagar efter 28 dagars administreringsperiod vara lämpligare (se hänvisning 16, 29). I sådana fall kan den senare provtagningstiden ersätta 3-dagarsprovtagningstiden och kräver vetenskaplig motivering.

▼M5

Könsceller

31. TGR-tester är väl lämpade för studier av genmutationsinduktion i hanliga könsceller (se hänvisning 7, 8, 27), där tidpunkten och kinetiken för spermatogenes är väldefinierade (se hänvisning 27). De låga antalet ägg tillgängliga för analys, även efter superovulation, och det faktum att det inte finns någon DNA-syntes i oocyten, utesluter bestämning av mutationer i honliga könsceller genom transgentester (se hänvisning 31).

32. Provtagningstiderna för hanliga könsceller bör väljas så att alla exponerade celltyper under könscellsbildningen provtas och så att det stadium som provtagningen är inriktad på har fått tillräcklig exponering. Den tid det tar för könsceller att utvecklas från spermatogoniestamceller till mogna spermier som når sädesledare/cauda epididymis är ca 49 dagar för mus (se hänvisning 36) och ca 70 dagar för råtta (se hänvisning 34, 35). Efter en 28-dagars exponering med en efterföljande tredagars provtagningsperiod kommer de ackumulerade spermier som samlats in från sädesledaren/cauda epididymis (se hänvisning 7, 8) att utgöra en population av celler som exponerats under ungefär den senare hälften av spermatogenesen, vilket inkluderar den meiotiska och postmeiotiska perioden men inte den spermatogonieperioden eller stamcellsperioden. För att adekvat ta prov på celler i sädesledaren/cauda epididymis som var spermatogoniestamceller under exponeringsperioden krävs ytterligare en provtagningstid på minst 7 veckor (möss) eller 10 veckor (råtta), efter avslutad behandling.

33. Celler extruderade från sädeskanalerna efter en period på 28 + 3 dagar utgör en blandad population rik på alla utvecklingsstadier av könsceller (se hänvisning 7, 8). Provtagning av dessa celler för påvisande av genmutationer ger inte en lika exakt bedömning av de stadier där könscellsmutationer induceras som den som kan erhållas genom provtagning av spermier från sädesledaren/cauda epididymis (eftersom det finns flera olika könscellstyper i prov från sädeskanalerna och dessutom somatiska celler som kontaminerar denna cellpopulation). Emellertid ger provtagning av celler från sädeskanalerna utöver spermatozoer från sädesledaren/cauda epididymis efter endast ett 28 + 3 dagars provtagningsschema viss täckning av celler som exponerats under flertalet faser i könscellsbildningen, vilket kan vara användbart för att upptäcka vissa könscellsmutagener.

Observationer

34. Allmänna kliniska observationer bör göras minst en gång per dag, helst vid samma tidpunkt varje dag med hänsyn till maximalt förväntade effekter efter doseringen. Djurens hälsotillstånd bör registreras. Minst två gånger dagligen bör djuren observeras med avseende på morbiditet och mortalitet. Alla djur bör vägas minst en gång i veckan. Mätning av foderkonsumtion bör göras minst en gång i veckan. Om testkemikalien tillförs via dricksvattnet bör även vattenkonsumtionen mätas vid varje byte av vatten och minst en gång i veckan. Djur som uppvisar icke-dödliga indikatorer på överskottstoxicitet bör avlivas innan slutförandet av testperioden (se hänvisning 23).

▼M5

Vävnadsinsamling

35. Den logiska grunden för vävnadsinsamlingen bör definieras tydligt. Eftersom det är möjligt att studera mutationsinduktion i praktiskt taget alla vävnader, bör valet av vävnader som ska samlas in baseras på skälet för att genomföra studien och befintliga mutagenitets-, cancerogenitets- eller toxicitetsdata för den undersökta kemikalien. Viktiga faktorer för övervägande bör omfatta administreringsväg (baserat på sannolika mänskliga exponeringsvägar), den förutsagda vävnadsdistributionen och möjlig verkningsmekanism. I avsaknad av bakgrundsinformation, bör flera somatiska vävnader som kan vara av intresse samlas in. Dessa bör representera snabbväxande och långsamt växande vävnader och vävnader på kontaktstället. Dessutom bör spermier från sädesledare/cauda epididymis och växande könsceller från sädeskanalerna (som beskrivs i punkterna 32 och 33) samlas in och lagras om framtida analyser av mutagenitet i könsceller krävs. Organvikter bör inhämtas, och för större organ, bör samma område samlas in på alla djur.

Lagring av vävnader och DNA

36. Vävnader (eller vävnadshomogenat) bör förvaras vid eller under – 70 °C och ska användas för DNA-isolering inom 5 år. Isolerat DNA, förvarat i kylskåp vid 4 °C i lämplig buffert, bör optimalt användas för mutationstest inom 1 år.

Val av vävnader för mutantanalys

37. Valet av vävnader bör baseras på överväganden såsom 1) administrationssättet eller första kontaktstället (t.ex. glandulär magsäck om administrationen är oral, lunga om administrationen sker via inandning eller hud om lokal applikation har använts) och 2) farmakokinetiska parametrar som observerats i allmäntoxicitetsstudier, vilket indikerar vävnadsdisposition, bibehållande eller ackumulation, eller målorgan för toxicitet. Om studier utförs för att följa upp cancerogenitetsstudier bör man överväga målvävnaderna för cancerogenitet. Valet av vävnader för analys bör maximera detekteringen av kemikalier som är direktverkande *in vitro*-mutagena, metaboliseras snabbt, mycket reaktiva eller absorberas dåligt, eller de för vilka målvävnaden bestäms genom administreringsvägen (se hänvisning 6).

38. I brist på bakgrundsinformation och med beaktande av kontaktstället på grund av administreringsvägen, bör levern och minst en snabbt delande vävnad (t.ex. glandulär magsäck, benmärg) utvärderas för mutagenitet. I de flesta fall kan de ovan angivna kraven uppnås genom analyser av två noggrant utvalda vävnader, men i vissa fall skulle tre eller fler behövas. Om det finns särskilda skäl att misstänka könscellseffekter, inklusive positiva effekter på somatiska celler, bör könscellsvävnaderna utvärderas avseende mutationer.

Mätmetoder

39. Standardlaboratoriemetoder eller publicerade metoder för detektion av mutanter finns tillgängliga för de rekommenderade transgena modellerna: *lacZ*-lambdabakteriofag och -plasmid (se hänvisning 30); *lacI*-mus (se hänvisning 2, 18); *gpt*-deltamus (se hänvisning 22); *gpt*-deltaråtta (se hänvisning 28); *cII* (se hänvisning 17). Ändringar bör motiveras och dokumenteras noga. Data från flera packningar kan läggas samman och användas för att uppnå ett tillräckligt antal plack eller kolonier. Emellertid kan behovet av ett stort antal packningsreaktioner för att uppnå det lämpliga antalet plack vara en indikation på dålig DNA-kvalitet. I sådana fall ska data beaktas med försiktighet eftersom den kan vara opålitlig. Det optimala antalet plack eller

▼M5

kolonier per DNA-prov styrs av den statistiska sannolikheten för att upptäcka tillräckligt många mutanter vid en viss spontan mutationsfrekvens. I allmänhet krävs minst 125 000 till 300 000 plack om den spontana mutationsfrekvens är i storleksordningen 3×10^{-5} (se hänvisning 15). För Big Blue® *lacI*-testet är det viktigt att visa att hela skalan av mutanta färgfenotyper kan detekteras genom införandet av lämpliga färgkontroller som behandlas jämsides med varje plattodling. Vävnaderna och de resulterande proverna (objekt) bör bearbetas och analyseras med hjälp av ett blockutförande, där objekt från vehikel-/lösningsmedelskontrollgruppen, den positiva kontrollgruppen (om den används) eller positivt kontroll-DNA (i förekommande fall) och varje behandlingsgrupp behandlas tillsammans.

DATA OCH RAPPORTERING

Behandling av resultat

40. Individuella djurdata bör presenteras i tabellform. Den experimentella enheten utgörs av djuret. Rapporten bör omfatta det totala antalet plackbildande enheter (pfu) eller kolonibildande enheter (cfu), antal mutanter samt mutantfrekvensen för varje vävnad från varje djur. Om det finns flera packnings-/aktiveringsreaktioner, bör antalet reaktioner per DNA-prov rapporteras. Även om data för varje enskild reaktion bör behållas behöver endast total pfu eller cfu rapporteras. Uppgifter om toxicitet och kliniska tecken enligt punkt 34 ska redovisas. Eventuella sekvenseringsresultat ska presenteras för varje mutant som analyseras, och resulterande mutationsfrekvensberäkningar för varje djur och vävnad ska visas.

Statistisk utvärdering och tolkning av resultaten

41. Det finns flera kriterier för att fastställa att ett resultat är positivt, t.ex. en dosrelaterad ökning av mutationsfrekvensen, eller en tydlig ökning av mutationsfrekvensen i enkeldosgruppen jämfört med lösningsmedels-/vehikelkontrollgruppen. Minst tre behandlade dosgrupper bör analyseras för att ge tillräckligt med uppgifter för dos-responsanalysen. Medan den biologiska relevansen för resultaten ska komma i främsta rummet kan lämpliga statistiska metoder användas som en hjälp vid utvärderingen av testresultateten (se hänvisning 4, 14, 15, 25, 26). Statistiska tester som används bör betrakta djuret som den experimentella enheten.

42. En testkemikalie för vilken resultatet inte uppfyller ovanstående kriterier i någon vävnad anses vara icke-mutagen i detta test. För den biologiska betydelsen av ett negativt resultat ska vävnadsexponeringen bekräftas.

43. För DNA-sekvensanalyser, finns ett antal statistiska metoder tillgängliga för att hjälpa till med tolkningen av resultaten (se hänvisning 1, 5, 9, 19).

44. Prövning av om de observerade värdena ligger inom eller utanför det historiska kontrollområdet kan ge vägledning för att utvärdera responsens biologiska betydelse (se hänvisning 32).

▼M5

Testrapport

45. Testrapporten ska innehålla följande information:

Testkemikalie:

— Identifieringsuppgifter och CAS-nr, om det är känt.

— Ursprung, partinummer om sådant finns.

— Fysikalisk form och renhetsgrad.

— Fysikalisk-kemiska egenskaper som är relevanta för genomförandet av studien.

— Testkemikaliens stabilitet, om den är känd.

Lösningsmedel/vehikel:

— Motivering för val av vehikel.

— Löslighet och stabilitet av testkemikalien i lösningsmedlet/vehikeln, om detta är känt.

— Sammansättning av foder-, dricksvatten- eller inandningsberedningar.

— Analytiska bestämningar av beredningar (t.ex. stabilitet, homogenitet, nominella koncentrationer).

Försöksdjur:

— Art/stam som används och motivering av valet.

— Djurens antal, ålder och kön.

— Ursprung, inhysning, foder etc.

— Individuell vikt hos försöksdjuren vid försökets början, inklusive kroppsviktsintervall, medelvärde och standardavvikelse för varje grupp.

Testbetingelser:

— Positiva och negativa kontrolldata (vehikel/lösningsmedel).

— Data från dosfinnande studie.

— Motivering för valet av dosnivå.

— Uppgifter om testkemikalieberedningen.

— Uppgifter om administreringen av testkemikalien.

— Motivering för administrationssätt.

— Metoder för mätning av djurtoxicitet, inklusive, i förekommande fall, histopatologiska eller hematologiska analyser och frekvensen av djurobservationer och mätningar av djurens kroppsvikt.

— Metoder för att verifiera att testkemikalien nått målvävnaden eller den allmänna cirkulationen, om negativa resultat erhålls.

▼M5

— Faktisk dos (mg/kg kroppsvikt/dag) beräknad genom testkemikaliens koncentration (ppm) i foder/dricksvatten samt konsumtionen, i tillämpliga fall.

— Uppgifter om foder- och vattenkvalitet.

— Detaljerad beskrivning av behandlings- och provtagningsscheman samt motivering av valen.

— Metod för avlivning.

— Förfaranden för att isolera och bevara vävnader.

— Metoder för isolering av gnagares genomiska DNA, räddning av transgenen från genomiskt DNA och överföring av transgent DNA till en bakterievärd.

— Ursprungs- och partinummer för alla celler, satser och reagenser (i förekommande fall).

— Metoder för räkning av mutanter.

— Metoder för molekylär analys av mutanter och användning för att korrigera klonalitet och/eller beräkna mutationsfrekvenser, i tillämpliga fall.

Resultat:

— Djurens skick före och under hela testperioden, inklusive tecken på toxicitet.

— Kropps- och organvikter vid avlivning.

— För varje vävnad/djur utvärderas antalet mutanter, antalet plack eller kolonier samt mutantfrekvensen.

— För varje vävnad/djurgrupp antalet packningsreaktioner per DNA-prov, totala antalet mutanter, medelvärdet för mutantfrekvensen, standardavvikelsen.

— Dos-responssamband, där detta är möjligt.

— För varje vävnad/djur, antalet oberoende mutanter och genomsnittmutationsfrekvensen där molekylär analys av mutationer utfördes.

— Data från jämsides behandlad och tidigare negativ kontroll med omfång, medelvärden och standardavvikelser.

— Data från jämsides behandlad positiv kontroll (eller data om DNA från tidigare positiv kontroll).

— Analytiska bestämningar, om det finns tillgängligt (t.ex. DNA-koncentrationer som används i packning, DNA-sekvenseringsdata);

— De statistiska analyser och metoder som använts.

Diskussion av resultaten

Slutsats

▼M5

LITTERATUR

1. *Adams,* W.T. och 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 och J. Vijg (1995), ‘Plasmid-based Transgenic Mouse Model for Studying *in vivo* Mutations’ *Nature*, 377(6550): 657–659

4. Carr, G.J. och 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. och 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 och 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. Förenta staterna*, 92: 7485–7489.

8. Douglas, G.R., J.D. Gingerich, L.M. Soper och 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. och 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 och J. Vijg(1989), ‘Efficient Rescue of Integrated Shuttle Vectors from Transgenic Mice: a Model for Studying Mutations *in vivo’, Proc. Natl. Acad. Sci. Förenta staterna,* 86(20): 7971–7975.

11. Gossen, J.A. och 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 och 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 och N. Yajima (2000), ‘In vivo Transgenic Mutation Assays’, *Environ. Mol. Mutagen*., 35: 253–259.

16. Heddle, J.A., H.-J. Martus och 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 och 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. Förenta staterna*, 93(17): 9073–9078.

18. Kohler, S.W., G.S. Provost, P.L. Kretz, A. Fieck, J.A. Sorge och 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 och 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 och 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 och 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 och 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°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 och 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 och 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 och 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 och 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 och N. Yajima (2003), '*In vivo* Transgenic Mutation Assays', *Mutation Res*., 540: 141–151.

30. Vijg, J. och G.R. Douglas (1996), 'Bacteriophage λ and Plasmid *lacZ* Transgenic Mice for studying Mutations *in vivo'* i: G. Pfeifer (ed.), *Technologies for Detection of DNA Damage and Mutations, Part II,* Plenum Press, New York, NY, Förenta staterna, s. 391–410.

▼**M5**

31. Yauk, C.L., J.D. Gingerich, L. Soper, A. MacMahon, W.G. Foster och 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/MONO(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. och 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., och P. M, Wassarman (eds.), *Physiology of Reproduction*, Elsevier, Nederländerna, 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**

Tillägg

DEFINITIONER

Administreringsperiod: Den totala perioden under vilken ett djur doseras.

Basparssubstitution: En typ av mutation som orsakar ersättning av en enda DNA-nukleotidbas med en annan DNA-nukleotidbas.

Kapsid: Proteinskalet som omger en viruspartikel.

Kemikalie: Ett ämne eller en blandning.

Klonal expansion: Produktionen av många celler från en enda (mutant) cell.

Kolonibildande enhet (CFU): Ett mått på livskraftigt bakterieantal.

Konkatamer: En lång sammanhängande biomolekyl som består av flera identiska kopior kopplade i serie.

Cos-ställe: Ett 12-nukleotid-segment av enkelsträngat DNA som finns i båda ändarna av den bakteriofaga lambdans dubbelsträngade genom.

Deletion: En mutation i vilken en eller flera (sekventiella) nukleotider går förlorade genom genomet.

Elektroporering: Tillämpning av elektriska pulser för att öka permeabiliteten hos cellmembran.

Endogen gen: En gen med ursprung hos genomet.

Extrabinomial variation: Större variationer i återkommande bedömningar av en populationsandel än vad som skulle förväntas om populationen hade en binomialfördelning.

Frameshift-mutation: En genetisk mutation som orsakas av insertioner eller deletioner av ett antal nukleotider som inte är jämnt delbara med tre inom en DNA-sekvens som kodar för ett protein/en peptid.

Insertion: Tillägg av en eller flera nukleotid-baspar i en DNA-sekvens.

Jackpot: Ett stort antal mutanter som uppstår genom klonal expansion av en enda mutation.

Stora deletioner: Deletioner i DNA av mer än flera kilobaser (som effektivt påvisas med Spi$^-$-selektionsanalys och *lacZ*-plasmidtester).

Ligering: Den kovalenta kopplingen mellan två ändar av DNA-molekyler med hjälp av DNA-ligas.

Mitogen: En kemikalie som stimulerar en cell att påbörja celldelning och utlöser mitos (dvs. celldelning).

Neutral gen: En gen som inte påverkas av positiva eller negativa selektionstryck.

Packning: Syntes av infektiösa fagpartiklar från en beredning av fagkapsid- och svansproteiner och en konkatamer av fag-DNA-molekyler. Används vanligen för att packa DNA klonad på en lambdavektor (åtskilda av cos-ställen) i infektiösa lambdapartiklar.

Packningseffektivitet: Den effektivitet med vilken packade bakteriofager återvinns i värdbakterier.

▼M5

Plackbildande enhet (pfu): Ett mått på livskraftigt bakteriofagantal.

Punktmutation: En allmän term för en mutation som påverkar endast en liten sekvens av DNA inklusive små insertioner, deletioner och basparssubstitutioner.

Positiv selektion: En metod som endast tillåter mutanter att överleva.

Reportergen: En gen vars muterade genprodukt lätt upptäcks.

Provtagningstid: I slutet av den tidsperiod, före avlivningen, under vilken kemikalien inte administreras och under vilka obearbetade DNA-skador fixeras till stabila mutationer.

Skyttelvektor: En vektor som är konstruerad så att den kan breda ut sig i två olika värdarter, i enlighet därmed kan DNA införas i en skyttelvektor och testas eller manipuleras i två olika celltyper eller två olika organismer.

Testkemikalie: Alla ämnen eller blandningar som testas med denna testmetod.

Transgen: Avser en organism vars genom har förändrats genom överföring av en gen eller gener från en annan art.

▼M7

B.59 HUDSENSIBILISERING IN CHEMICO: DIRECT PEPTIDE REACTIVITY ASSAY (DPRA)

INLEDNING

Den här testmetoden motsvarar OECD:s testriktlinje (TG) 442C (2015). Hudsensibiliserande ämnen är ämnen som leder till en allergisk reaktion efter hudkontakt enligt definitionen i FN:s globala harmoniserade system för klassificering och märkning av kemikalier (GHS) (1) och förordning (EC) nr 1272/2008 om klassificering, märkning och förpackning av ämnen och blandningar (CLP-förordningen) ([1]). Denna testmetod utgörs av ett förfarande in chemico (Direct Peptide Reactivity Assay – DPRA) som används för att skilja mellan hudsensibiliserande ämnen och icke-hudsensibiliserande ämnen enligt FN:s GHS-klassificering och CLP-förordningen.

Det råder allmän enighet om de viktigaste biologiska händelserna som utlöser hudsensibilisering. Den befintliga kunskapen om de kemiska och biologiska mekanismer som är förknippade med hudsensibilisering har sammanfattats i form av AOP (Adverse Outcome Pathway) (2), från den inledande molekylära händelsen via de mellanliggande händelser som orsakar den negativa effekten, nämligen allergisk kontaktdermatit hos människor och överkänslighet mot kontakt hos gnagare. Inom AOP för hudsensibilisering är den molekylära inledande händelsen en kovalent bindning av elektrofila ämnen till nukleofila centrum i hudproteiner.

Bedömning av hudsensibiliteten har normalt inneburit användning av försöksdjur. I de klassiska metoderna som baseras på marsvin, Magnusson Kligman Guinea Pig Maximisation Test (GPMT) och Buehler-testet (TM B.6 (3)), undersöks både induktions- och eliciteringsfaserna i hudsensibilisering. Ett murintest, Local Lymph Node Assay (LLNA, TM B.42 (4)) och dess två icke radioaktiva modifieringar, LLNA: DA (TM B.50 (5)) och LLNA: BrdU-ELISA (TM B.51 (6)), som endast bedömer induktionsresponsen, har också vunnit erkännande eftersom de är mer fördelaktiga än marsvinstester ur djurskyddssynpunkt och ger en objektiv mätning av induktionsfasen i hudsensibilisering.

Mer nyligen har man kommit fram till att mekaniskt baserade tester in chemico och in vitro kan anses vara vetenskapligt giltiga för utvärdering av kemikaliers hudsensibiliserande faror. Det är dock nödvändigt att kombinera metoder utan försöksdjur (in silico, in chemico, in vitro) inom IATA (Integrated Approaches to Testing and Assessment) för att fullständigt ersätta de djurförsök som används i dagsläget, med tanke på AOP:s begränsade mekanistiska täckning av de testmetoder utan försöksdjur som finns tillgängliga för närvarande (2) (7).

Tanken med DPRA-metoden är att den ska ersätta den molekylära inledande händelsen vid hudsensibiliserande AOP, nämligen proteinreaktiviteten, genom att kvantifiera testkemikaliernas reaktivitet mot modellens syntetiska peptider, som innehåller antingen lysin eller cystein (8). Procentvärdena för minskning av cystein- och lysinpeptidnivåer används sedan för att kategorisera ämnet i en av fyra reaktivitetsklasser i syfte att skilja mellan hudsensibiliserande och icke-hudsensibiliserande ämnen (9).

([1]) Europaparlamentets och rådets förordning (EG) nr 1272/2008 av den 16 december 2008 om klassificering, märkning och förpackning av ämnen och blandningar, ändring och upphävande av direktiven 67/548/EEG och 1999/45/EG samt ändring av förordning (EG) nr 1907/2006 (EUT L 353, 31.12.2008, s. 1).

▼M7

DPRA har utvärderats i en valideringsstudie som leddes av EU:s referenslaboratorium inom Europeiska centret för bestämning av alternativa metoder (EURL ECVAM) samt i efterföljande oberoende granskningar av EURL ECVAM:s rådgivande vetenskapliga kommitté (ESAC), och ansågs vetenskapligt giltig (10) för användning som en del av en IATA i syfte att skilja mellan hudsensibiliserande och icke-hudsensibiliserande ämnen vid faroklassificering och märkning. Exempel på användningen av DPRA-data i kombination med annan information finns i litteraturen (11) (12) (13) (14).

Definitioner av begreppen finns i tillägg 1.

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN, TILLÄMPLIGHET OCH BEGRÄNSNINGAR

Sambandet mellan proteinreaktivitet och risk för hudsensibilisering är väletablerat (15) (16) (17). Proteinbindning är endast en av de viktiga händelserna i processen. Trots den molekylära inledande händelsen i AOP-hudsensibilisering kan det hända att den information om proteinreaktivitet som genereras med metoder med och utan testning inte är tillräcklig i sig för att dra slutsatser om kemikaliers hudsensibiliserande potential. De data som genereras med denna testmetod bör därför övervägas inom ramen för integrerade strategier som IATA och kombineras med annan kompletterande information, t.ex. från in vitro-test rörande andra nyckelhändelser i AOP-hudsensibiliseringen samt metoder utan testning, inklusive jämförelser från kemiskt analoga ämnen.

Denna testmetod kan, i kombination med annan kompletterande information, användas för att skilja mellan hudsensibiliserande kemikalier (dvs. GHS-/CLP-kategori 1) och icke-hudsensibiliserande ämnen inom ramen för IATA. Testmetoden kan inte användas fristående, vare sig för att dela in hudsensibiliserande ämnen i underkategorierna 1A och 1B enligt GHS/CLP, eller för att förutsäga styrka när det gäller säkerhetsbedömningsbeslut. Beroende på tillämpligt regelverk kan dock ett positivt resultat med DPRA användas fristående för att klassificera kemikalier i GHS-/CLP-kategori 1.

DPRA-testmetoden har visat sig vara överförbar till laboratorier som har erfarenhet av analyser med vätskekromatografi (HPLC). Testmetodens förväntade reproducerbarhet är i storleksordningen 85 % inom laboratorier och 80 % mellan laboratorier (10). De resultat som genereras i valideringsstudien (18) och publicerade undersökningar (19) visar generellt att noggrannheten hos DPRA när det gäller att skilja mellan hudsensibiliserande ämnen (dvs. GHS-/CLP-kategori 1) och icke-hudsensibiliserande kemikalier är 80 % (N = 157) med en känslighet på 80 % (88/109) och en specificitet på 77 % (37/48) vid en jämförelse med LLNA-resultat. Det är mer sannolikt att DPRA underskattar kemikalier som visar en låg till måttlig hudsensibiliserande styrka (dvs. GHS-/CLP-underkategori 1B) än kemikalier som visar en hög hudsensibiliserande styrka (dvs. GHS/CLP-underkategori 1A) (18) (19). De noggrannhetsvärden som anges här för DPRA som en fristående testmetod är dock endast vägledande, eftersom testmetoden bör övervägas i kombination med andra informationskällor inom ramen för en IATA och enligt beskrivningen i punkt 9. Vid utvärderingen av testmetoder med avseende på hudsensibilisering utan djurförsök bör man dessutom tänka på att både LLNA-testet och andra djurförsök kanske inte fullständigt avspeglar situationen för de arter som är av intresse, t.ex. människor. Tillgängliga uppgifter visar att DPRA är tillämplig på testkemikalier som täcker en rad olika organiska funktionella grupper, reaktionsmekanismer, hudsensibiliseringsstyrkor (detta har fastställts i in vivo-undersökningar) och fysikalisk-kemiska egenskaper (8) (9) (10) (19). Sammantaget visar informationen att DPRA bidrar till att identifiera risker för hudsensibilisering.

▼M7

I denna metod avser begreppet ”testkemikalie” endast testade kemikalier. Frågan om huruvida DPRA är tillämplig på testning av ämnen och/eller blandningar tas inte upp här. Denna testmetod är inte tillämplig på testning av metallföreningar, eftersom de är kända att reagera på proteiner med andra mekanismer än kovalent bindning. Testkemikalien bör vara löslig i ett lämpligt lösningsmedel vid en slutlig koncentration på 100 mM (se punkt 18). Testkemikalier som inte är lösliga vid denna koncentration kan dock testas vid lägre lösliga koncentrationer. I ett sådant fall kan ett positivt resultat fortfarande användas som underlag för att identifiera testkemikalien som hudsensibiliserande. Definitiva slutsatser om avsaknad av reaktivitet bör dock inte dras från negativa resultat. För närvarande finns endast begränsad information om DPRA:s tillämplighet på blandningar med känd sammansättning (18) (19). DPRA anses dock vara tekniskt tillämplig på testning av multikomponentämnen och blandningar med känd sammansättning (se punkt 18). Innan testmetoden används på en blandning i syfte att samla in data för ett lagstadgat ändamål bör man överväga om, och i så fall varför, den kommer att ge godtagbara resultat för det syftet. Sådana överväganden är inte nödvändiga om blandningen måste provas enligt lag. Beroende på testkemikaliens och peptidens definierade molförhållande kan den nuvarande prediktionsmodellen inte användas för komplexa blandningar med okänd sammansättning eller ämnen med okänd eller varierande sammansättning, komplexa reaktionsprodukter eller biologiska material (dvs. UVCB-ämnen). För detta ändamål är det nödvändigt att utveckla en ny prediktionsmodell baserad på en gravimetrisk strategi. Om det finns bevis för att testmetoden inte är tillämplig på andra specifika kemikaliekategorier bör den inte användas för dessa kategorier.

Testmetoden är en in chemico-metod som inte omfattar ett metaboliskt system. Kemikalier som kräver enzymatisk bioaktivering för att deras hudsensibiliserande potential ska aktiveras (t.ex. prohaptener) kan inte detekteras med denna testmetod. Kemikalier som blir hudsensibiliserande efter abiotisk transformation (dvs. prehaptener) rapporteras i vissa fall detekteras korrekt av testmetoden (18). Mot bakgrund av ovanstående bör negativa resultat som erhålls med testmetoden tolkas inom ramen för de fastställda begränsningarna och tillsammans med andra informationskällor inom ramen för en IATA. Testkemikalier som saknar en kovalent bindning till peptiden, men som får peptiden att oxidera (t.ex. cysteindimerisering) kan leda till en eventuell överskattning av peptidens minskning, vilket i sin tur eventuellt kan leda till falska positiva förutsägelser och/eller till att kemikalien anvisas en högre reaktivitetsklass (se punkterna 29 och 30).

Såsom beskrivits bidrar DPRA till att skilja mellan hudsensibiliserande och icke-hudsensibiliserande kemikalier. Metoden kan eventuellt även bidra till bedömningen av sensibiliseringspotential (11) vid användning av integrerade strategier såsom IATA. Det krävs dock ytterligare arbete, företrädesvis baserat på data om människor, för att avgöra om DPRA-resultat eventuellt kan ligga till grund för bedömningar av sensibiliseringspotential.

TESTPRINCIP

DPRA är en *in chemico*-metod som kvantifierar den kvarstående koncentrationen av peptider som innehåller cystein eller lysin efter en 24-timmars inkubationsperiod med testkemikalien vid 25 ± 2,5 °C. De syntetiska peptiderna innehåller fenylalanin för att underlätta detektering. Den relativa peptidkoncentrationen mäts med vätskekromatografi (HPLC), med gradienteluering och UV-detektion vid 220 nm. Därefter beräknas procentvärdena för minskning av cystein- och lysinpeptidnivåer och används i en prediktionsmodell (se punkt 29), som gör det möjligt att kategorisera ämnet i en av fyra reaktivitetsklasser, som används för att skilja mellan hudsensibiliserande och icke-hudsensibiliserande ämnen (9).

▼M7

För att visa att det finns tillräcklig erfarenhet av testet innan det används för rutintestning bör laboratoriet visa teknisk kompetens med hjälp av de tio kvalifikationsämnen som anges i tillägg 2.

FÖRFARANDE

Denna testmetod är baserad på DPRA DB-ALM-protokoll nr 154 (20), som är det protokoll som använts för EURL ECVAM:s samordnade valideringsstudie. Detta protokoll bör tillämpas när metoden genomförs och används i laboratoriet. Nedan följer en beskrivning av de huvudsakliga delarna i och förfarandena för DPRA. Om en alternativ HPLC-konfiguration används bör laboratoriet visa att den motsvarar den validerade konfiguration som beskrivs i DB-ALM-protokollet (t.ex. genom att testa kvalifikationsämnena i tillägg 2).

Beredning av cystein- eller lysinpeptider

Nya stamlösningar av cystein (Ac-RFAA**C**AA-COOH) och lysin (Ac-RFAA-**K**AA-COOH) innehållande syntetiska peptider med en renhetsgrad på över 85 % och helst inom intervallet 90–95 %, bör beredas strax innan inkubationen med testkemikalien. Den slutliga koncentrationen av cysteinpeptider bör vara 0,667 mM i pH 7,5 fosfatbuffert och den slutliga koncentrationen av lysinpeptider bör vara 0,667 mM i pH 10,2 ammoniumacetatbuffert. HPLC-körningssekvensen bör ställas in så att HPLC-analystiden är mindre än 30 timmar. När det gäller den HPLC-konfiguration som används i valideringsstudien och som beskrivs i denna testmetod kan man samla upp till 26 analysprover (inbegripet testkemikalien, den positiva kontrollen och ett lämpligt antal lösningskontroller baserat på det antal enskilda lösningsmedel som används i testet, vart och ett testat tre gånger) i en enda HPLC-körning. Identiska stamlösningar av cystein- och lysinpeptider bör användas i alla replikat som analyseras i samma körning. Enskilda peptidsatser bör provas för att kontrollera att lösligheten är lämplig före användning.

Beredning av testkemikalien

Testkemikaliens löslighet i ett lämpligt lösningsmedel bör bedömas innan försöket utförs. Bedömningen bör göras enligt det upplösningsförfarande som beskrivs i DPRA DB-ALM-protokollet (20). Testkemikalien löses upp fullständigt med ett lämpligt lösningsmedel. Eftersom testkemikalien i DPRA-testet inkuberas i ett stort överskott av antingen cystein- eller lysinpeptider anses en visuell kontroll av bildningen av en klar lösning vara tillräcklig för att fastställa att testkemikalien (och alla dess komponenter vid testning av ett multikomponentämne eller en blandning) har lösts upp. Lämpliga lösningsmedel är acetonitril, vatten, 1:1 blandning vatten och acetonitril, isopropanol, aceton eller 1:1 blandning aceton och acetonitril. Andra lösningsmedel kan användas om de inte inverkar på peptidens stabilitet, vilket övervakas med referenskontroller (dvs. prover av enbart peptiden löses upp i det berörda lösningsmedlet, se tillägg 3). Om testkemikalien inte är löslig i några av dessa lösningsmedel bör man som ett sista alternativ försöka att lösa upp den i 300 µL DMSO och späda ut den lösningen med 2 700 µL acetonitril. Om testkemikalien inte är löslig i den blandningen heller bör man försöka lösa upp samma mängd av testkemikalien i 1 500 µL DMSO och späda ut den lösningen med 1 500 µL acetonitril. Testkemikalien bör vägas i förväg i glasflaskor och lösas upp omedelbart före testning i ett lämpligt lösningsmedel för att bereda en lösning på 100 mM. För blandningar och multikomponentämnen med känd sammansättning bör man fastställa en enda renhetsgrad genom summan av andelen av dess beståndsdelar (förutom vatten) samt en

▼M7

enda uppskattad molekylärvikt med hänsyn till individuell molekylärvikt för varje komponent i blandningen (förutom vatten) och deras individuella andelar. Den resulterande renhetsgraden och uppskattade molekylärvikten bör sedan användas för att beräkna den vikt av testkemikalien som krävs för att bereda en lösning på 100 mM. När det gäller polymerer för vilka det inte går att fastställa en dominerande molekylärvikt bör monomerens molekylärvikt (eller den uppskattade molekylärvikten för de olika monomerer som utgör polymeren) övervägas för beredningen av lösningen på 100 mM. Vid testning av blandningar, multikomponentämnen eller polymerer med känd sammansättning bör man även överväga att testa den rena kemikalien. För flytande kemikalier bör den rena kemikalien testas som den är: utan föregående utspädning genom inkubation med cystein- respektive lysinpeptiderna vid molförhållandena 1:10 och 1:50. För fasta kemikalier bör testkemikalien lösas upp i sin högsta lösningsbara koncentration i samma lösningsmedel som använts för att bereda 100 mM-lösningen. Den bör sedan testas som den är: utan ytterligare utspädning genom inkubation med cystein- respektive lysinpeptiderna vid förhållandena 1:10 och 1:50. Överensstämmande resultat (reaktiva och icke-reaktiva) mellan 100 mM-lösningen och den rena kemikalien bör möjliggöra en definitiv slutsats om resultatet.

Beredning av den positiva kontrollen, referenskontrollerna och kontrollerna av sameluering

Kanelaldehyd (CAS 104-55-2, ≥ 95 % livsmedelskvalitet) bör användas som positiv kontroll vid en koncentration på 100 mM i acetonitril. Andra lämpliga positiva kontroller som företrädesvis ger minskningsvärden i mitten av intervallet kan användas om historiska data finns tillgängliga för att härleda jämförbara acceptanskriterier. Dessutom bör även referenskontroller (dvs. prover som endast innehåller peptiden upplöst i lämpligt lösningsmedel) ingå i HPLC-körningssekvensen. Referenskontroller används för att kontrollera HPLC-systemets lämplighet före analysen (referenskontroller A), referenskontrollernas stabilitet över tiden (referenskontroller B) samt för att kontrollera att det lösningsmedel som används för att lösa upp testkemikalien inte påverkar procentvärdet för peptidens minskning (referenskontroller C) (se tillägg 3). Lämpliga referenskontroller för varje kemikalie används för att beräkna procentvärdet för peptidens minskning för den kemikalien (se punkt 26). Dessutom bör en samelueringskontroll bestående av endast testkemikalien för varje analyserad testkemikalie ingå i körningssekvensen för att upptäcka eventuell sameluering av testkemikalien med antingen lysin- eller cysteinpeptiden.

Inkubation av testkemikalien med cystein- och lysinpeptidlösningar

Cystein- och lysinpeptidlösningarna bör inkuberas i autosampler-glasflaskor med testkemikalien vid ett förhållande på 1:10 respektive 1:50. Om en fällning omedelbart observeras när lösningen med testkemikalien tillsätts peptidlösningen på grund av att testkemikalien har en låg upplösning i vatten, kan man inte vara säker på hur stor mängd av testkemikalien som finns kvar i lösningen för att reagera med peptiden. I ett sådant fall kan ett positivt resultat fortfarande användas, men ett negativt resultat är osäkert och bör tolkas med vederbörlig försiktighet (se även anvisningarna i punkt 11 om testning av kemikalier som inte är lösliga upp till en lösning på 100 mM). Reaktionslösningen bör förvaras i mörker vid 25 ± 2,5 °C i 24 ± 2 timmar innan HPLC-analysen körs. Varje testkemikalie bör analyseras tre gånger för båda peptiderna. Proverna ska kontrolleras visuellt före HPLC-analysen. Om en fällning eller en fasseparation observeras kan proverna centrifugeras vid låg hastighet (100–400 × g) så att utfällningen förpassas till botten av flaskan som en försiktighetsåtgärd, eftersom stora mängder utfällningar kan fastna i HPLC-tuberna eller i kolonnerna Om en fällning eller en fasseparation observeras efter inkubationsperioden kan peptidernas minskning underskattas, vilket gör att man inte kan dra en tillräckligt tillförlitlig slutsats om avsaknad av reaktivitet i händelse av ett negativt resultat.

▼M7

Beredning av standardkalibreringskurvan för HPLC

En standardkalibreringskurva bör genereras för både cystein- och lysinpeptiderna. Peptidstandarderna bör beredas i en lösning av 20 % eller 25 % acetonitrilbuffert med användning av fosfatbuffert (pH 7,5) för cysteinpeptiden och ammoniumacetatbuffert (pH 10,2) för lysinpeptiden. Om serieutspädningsstandarder används för peptidstamlösningen (0,667 mM) bör sex kalibreringslösningar beredas för att täcka intervallet från 0,534 till 0,0167 mM. Ett blankprov av utspädningsbufferten bör också ingå i standardkalibreringskurvan. Kalibreringskurvorna bör ha en $r^2 > 0,99$.

Förberedelse av HPLC och HPLC-analys

HPLC-systemets lämplighet bör kontrolleras innan analysen utförs. Peptidernas minskning övervakas av HPLC kombinerat med en UV-detektor (detektor med fotodiodkretsar eller en detektor med våglängdsabsorption med en signal på 220 nm). En lämplig kolonn installeras i HPLC-systemet. Den HPLC-konfiguration som beskrivs i det validerade protokollet använder en Zorbax SB-C-18 2,1 mm × 100 mm × 3.5 mikron som föredragen kolonn. Med denna HPLC-kolonn med omvänd fas bör hela systemet bringas i jämvikt vid 30 °C med 50 % fas A (0,1 % (v/v) trifluorättiksyra i vatten) och 50 % fas B (0,085 % (v/v) trifluorättiksyra i acetonitril) i minst två timmar före körning. HPLC-analysen bör utföras med hjälp av en flödeshastighet på 0,35 ml/min och en linjär gradient från 10 % till 25 % acetonitril under 10 minuter, följt av en snabb ökning till 90 % acetonitril för att avlägsna andra material. Lika stora volymer av varje standard, prov och kontroll bör injiceras. Kolonnen bör omkalibreras under initiala förhållanden i sju minuter mellan injektionerna. Om en annan HPLC-kolonn med omvänd fas används kan de konfigurationsparametrar som beskrivs ovan behöva justeras för att garantera lämplig eluering och integration av cystein- och lysinpeptiderna, inklusive injektionsvolymen, som kan variera beroende på använt system (vanligen i intervallet 3–10 µl). Om en alternativ HPLC-konfiguration används är det viktigt att laboratoriet visar att den motsvarar den validerade konfiguration som beskrivs ovan (t.ex. genom att testa kvalifikationsämnena i tillägg 2). Absorbansen övervakas vid 220 nm. Om en detektor med fotodiodkretsar används ska absorbans vid 258 nm också registreras. Det bör noteras att vissa acetonitrilpartier kan ha en negativ inverkan på peptidernas stabilitet. Detta måste bedömas när en ny acetonitrilsats används. Förhållandet mellan topparean vid 220 och topparean vid 258 kan användas som en indikator på sameluering. För varje prov ger ett förhållande i intervallet 90 % < medelvärdet ([1]) för kontrollprovernas topparea < 100 % en god indikation på att sameluering inte har förekommit.

Vissa testkemikalier kan få cysteinpeptiden att oxidera. Toppen på den dimeriserade cysteinpeptiden kan övervakas visuellt. Om dimerisering tros ha förekommit bör detta registreras eftersom procentvärdet för peptidens minskning kan överskattas, vilket leder till falska positiva förutsägelser och/eller till att kemikalien anvisas en högre reaktivitetsklass (se punkterna 29 och 30).

HPLC-analysen av cystein- och lysinpeptiderna kan utföras parallellt (om två HPLC-system finns tillgängliga) eller olika dagar. Om analysen utförs olika dagar ska nya testkemikalielösningar beredas för båda försöken varje dag. Analysen bör planeras för att säkerställa att injiceringen av det första provet startar 22 till 26 timmar efter det att testkemikalien blandades med peptidlösningen. HPLC-körningssekvensen bör ställas in så att HPLC-analystiden är mindre än 30 timmar. När det gäller den HPLC-konfiguration som används i valideringsstudien

([1]) Medelvärde avser aritmetiskt medelvärde genomgående i dokumentet.

▼M7

och som beskrivs i denna testmetod kan man samla upp till 26 analysprover i en enda HPLC-körning (se även punkt 17). Ett exempel på en HPLC-analyssekvens ges i tillägg 3.

DATA OCH RAPPORTERING

Utvärdering av data

Koncentrationen av cystein- eller lysinpeptiderna fastställs fotometriskt vid 220 nm i varje prov genom mätning av topparean (Area Under the Curve, AUC) för lämpliga toppar och genom beräkning av peptidkoncentrationen med användning av den linjära kalibreringskurva som härrörts från standarderna.

Procentvärdet för peptidens minskning fastställs i varje prov genom att topparean mäts och divideras med medelvärdet för topparean för relevanta referenskontroller (se tillägg 3) enligt den formel som beskrivs nedan.

$$Procent\ peptidminsking = \left[1 - \left(\frac{peptidens\ topparea\ i\ replikatinjektion}{peptidens\ genomsnittliga\ topparea\ i\ referenskontroller\ C}\right)\right] \times 100$$

Kriterier för godkännande

Följande kriterier bör uppfyllas för att en körning ska anses vara giltig:

a) Standardkalibreringskurvan ska ha en $r^2 > 0{,}99$.

b) Procentmedelvärdet för peptidernas minskning för de tre replikaten i den positiva kontrollen med kanelaldehyd bör vara mellan 60,8 % och 100 % för cysteinpeptider och mellan 40,2 % och 69,0 % för lysinpeptider. Högsta standardavvikelse (SD) för det positiva kontrollreplikatet bör vara < 14,9 % för procentvärdet för minskning av cystein och < 11,6 % för procentvärdet för minskning av lysin.

c) Medelvärdet för peptidkoncentrationen i referenskontrollerna A bör vara 0,50 ± 0,05 mM och koefficientvariationen (CV) för peptidernas toppareor för de nio referenskontrollerna B och C i acetonitril bör vara < 15,0 %.

Om ett eller flera av dessa kriterier inte är uppfyllt bör körningen göras om.

Följande kriterier bör uppfyllas för att testresultatet för testkemikalien ska anses vara giltigt:

a) Högsta standardavvikelse för testkemikaliereplikaten bör vara < 14,9 % för procentvärdet för minskning av cystein och < 11,6 % för procentvärdet för minskning av lysin.

b) Peptidkoncentrationens medelvärde för de tre referenskontrollerna C i lämpligt lösningsmedel bör vara 0,50 ± 0,05 mM. Om dessa kriterier inte är uppfyllda bör data förkastas och körningen bör göras om för den specifika testkemikalien.

Prediktionsmodell

Procentmedelvärdet för minskning av cystein och lysin beräknas för varje testkemikalie. Negativ minskning anses vara ”0” när medelvärdet beräknas. Genom att använda den prediktionsmodell med cystein 1:10/lysin 1:50 som visas i tabell 1 bör gränsvärdet 6,38 % för genomsnittlig minskning av peptiden användas för att skilja mellan hudsensibiliserande och icke-hudsensibiliserande kemikalier inom ramen för en IATA. Prediktionsmodellen kan användas för att tilldela testkemikalien en reaktivitetsklass (dvs. låg, måttlig och hög reaktivitet) som underlag för bedömningen av sensibiliseringspotential inom ramen för en IATA.

▼M7

Tabell 1

Prediktionsmodell [1] **för cystein 1:10/lysin 1:50**

Medelvärde i procent för minskning av cystein och lysin	Reaktivitetsklass	DPRA-förutsägelse [2]
0 % ≤ medelvärde % minskning ≤ 6,38 %	Ingen eller minimal reaktivitet	Negativ
6,38 % < medelvärde % minskning ≤ 22,62 %	Låg reaktivitet	Positiv
22,62 % < medelvärde % minskning ≤ 42,47 %	Måttlig reaktivitet	
42,47 % medelvärde % minskning ≤ 100 %	Hög reaktivitet	

[1] Siffrorna avser statistiskt genererade gränsvärden och har inget samband med mätningens precision.
[2] En DPRA-förutsägelse bör övervägas inom ramen för en IATA och enligt anvisningarna i punkterna 9 och 12.

Det kan hända att testkemikalien (ämnet eller en eller flera komponenter av ett multikomponentämne eller en blandning) absorberar betydligt vid 220 nm och har samma retentionstid som peptiden (sameluering). Sameluering kan lösas genom att HPLC-konfigurationen justeras lite för att ytterligare separera testkemikaliens och peptidens elueringstid. Om en alternativ HPLC-konfiguration används för att lösa samelueringen bör dess motsvarighet till den validerade konfigurationen visas (t.ex. genom att testa kvalifikationsämnena i tillägg 2). Vid sameluering kan peptidens topp inte integreras och det är inte möjligt att beräkna procentvärdet för peptidens minskning. Om sameluering av sådana kemikalier förekommer med både cystein- och lysinpeptiderna bör analysen redovisas som ”tvetydig”. Om sameluering endast förekommer med lysinpeptiden kan prediktionsmodellen med cystein 1:10 i tabell 2 användas.

Tabell 2

Prediktionsmodell 1 med cystein 1:10 [1]

Cystein (Cys) % minskning	Reaktivitetsklass	DPRA-förutsägelse [2]
0 % ≤ Cys % minskning ≤ 13,89 %	Ingen eller minimal reaktivitet	Negativ
13,89 % < Cys % minskning ≤ 23,09 %	Låg reaktivitet	Positiv
23,09 % < Cys % minskning ≤ 98,24 %	Måttlig reaktivitet	
98,24 % < Cys % minskning ≤ 100 %	Hög reaktivitet	

[1] Siffrorna avser statistiskt genererade gränsvärden och har inget samband med mätningens precision.
[2] En DPRA-förutsägelse bör övervägas inom ramen för en IATA och enligt anvisningarna i punkterna 9 och 12.

Det kan finnas andra fall där överlappningen i retentionstiden mellan testkemikalien och en av peptiderna är ofullständig. I ett sådant fall kan procentvärdena för peptidens minskning uppskattas och användas i prediktionsmodellen med cystein 1:10/lysin 1:50, men det är inte möjligt att med noggrannhet tilldela testkemikalien en reaktivitetsklass.

▼M7

En enda HPLC-analys för både cystein- och lysinpeptiden bör vara tillräcklig för testkemikalien om resultatet är otvetydigt. Om resultat nära gränsvärdet har använts för att skilja mellan positiva och negativa resultat (dvs. gränsresultat) kan dock ytterligare testning vara nödvändig. I situationer där det genomsnittliga procentvärdet för minskning ligger inom intervallet 3 % till 10 % för prediktionsmodellen cystein 1:10/lysin 1:50 eller procentvärdet för cysteinets minskning ligger inom intervallet 9 % till 17 % för prediktionsmodellen med cystein 1:10, bör en andra körning övervägas och även en tredje om resultaten från de två första körningarna inte överensstämmer.

Testrapport

Testrapporten ska innehålla följande information:

Testkemikalie

— Monokomponentämne:

  — Kemisk beteckning, såsom IUPAC- eller CAS-beteckningar, CAS-nummer, SMILES- eller InChI-kod, strukturell formel och/eller andra beteckningar.

  — Fysiskt utseende, vattenlöslighet, molekylärvikt och ytterligare relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper, i den mån sådana uppgifter finns tillgängliga.

  — Renhet, kemisk beteckning för föroreningar i förekommande fall och när så är praktiskt möjligt.

  — Behandling före testning, om detta är tillämpligt (t.ex. uppvärmning, finfördelning).

  — Testade koncentrationer.

  — Uppgifter om lagringsförhållanden och stabilitet i den mån sådana uppgifter finns tillgängliga.

— Multikomponentämne, UVCB och blandningar:

  — Karakteriseras så långt som möjligt genom t.ex. kemisk beteckning (se ovan), renhet, kvantitativ förekomst och relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper (se ovan) hos beståndsdelarna, i den mån sådana uppgifter finns tillgängliga.

  — Fysiskt utseende, vattenlöslighet och ytterligare relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper, i den mån sådana uppgifter finns tillgängliga.

  — Molekylvikt eller uppskattad molekylvikt för blandning/polymerer med kända sammansättningar eller annan information som är relevant för utförandet av undersökningen.

  — Behandling före testning, om detta är tillämpligt (t.ex. uppvärmning, finfördelning).

  — Testade koncentrationer.

  — Uppgifter om lagringsförhållanden och stabilitet i den mån sådana uppgifter finns tillgängliga.

Kontroller

— Positiv kontroll

  — Kemisk beteckning, såsom IUPAC- eller CAS-beteckningar, CAS-nummer, SMILES- eller InChI-kod, strukturell formel och/eller andra beteckningar.

  — Fysiskt utseende, vattenlöslighet, molekylvikt och ytterligare relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper, i den mån sådana uppgifter finns tillgängliga.

  — Renhet, kemisk beteckning för föroreningar i förekommande fall och när så är praktiskt möjligt.

▼M7

— Behandling före testning, om detta är tillämpligt (t.ex. uppvärmning, finfördelning).

— Testade koncentrationer.

— Uppgifter om lagringsförhållanden och stabilitet i den mån sådana uppgifter finns tillgängliga.

— Hänvisning till historiska positiva kontrollresultat som visar lämpliga acceptanskriterier för körningarna, i förekommande fall.

— Lösningsmedel/vehikel

— Lösningsmedel/vehikel och förhållandet mellan dess beståndsdelar, i förekommande fall.

— Kemiska beteckningar, såsom IUPAC- eller CAS-beteckningar, CAS-nummer och/eller andra beteckningar.

— Renhet, kemisk beteckning för föroreningar i förekommande fall och när så är praktiskt möjligt.

— Fysiskt utseende, molekylvikt och ytterligare relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper om andra lösningsmedel/vehiklar än de som anges i testmetoden används, i den mån sådan information finns tillgänglig.

— Uppgifter om lagringsförhållanden och stabilitet i den mån sådana uppgifter finns tillgängliga.

— Motivering för valet av lösningsmedel för varje testkemikalie.

— För acetonitril, resultat från testet av effekten på peptidens stabilitet.

Beredning av peptiderna, den positiva kontrollen och testkemikalien

— Karakterisering av peptidlösningarna (leverantör, parti, exakt vikt för peptiderna, tillsatt volym till stamlösningen).

— Karakterisering av den positiva kontrollösningen (exakt vikt för det positiva kontrollämnet, tillsatt volym för testlösningen).

— Karakterisering av testkemikalielösningarna (exakt vikt för testkemikalien, tillsatt volym för testlösningen.

HPLC-instrumentinställningar samt analys

— Typ av HPLC-instrument, HPLC-kolonner och förkolonner, detektor och autosampler.

— Relevanta parametrar för HPLC-analysen, såsom kolonntemperatur, injektionsvolymer, flödeshastighet och gradient.

Systemets lämplighet

— Topparea för peptiden vid 220 nm för varje standard samt referenskontroll A-replikat.

— Linjär kalibreringskurva i diagram, rapporterad r^2.

— Peptidkoncentration för varje referenskontroll A-replikat.

— Medelvärde för peptidkoncentrationen (mM) för de tre referenskontrollerna, referenskontroll A, SD och CV.

— Peptidkoncentration för referenskontrollerna A och C.

▼M7

Analyssekvens

— För referenskontroller:

  — Peptidens topparea vid 220 nm för varje B- och C-replikat.

  — Medelvärde för peptidens topparea vid 220 nm för de nio referenskontrollerna B och C i acetonitril, SD och CV (för referenskontrollernas stabilitet under analystiden).

  — För varje använt lösningsmedel, medelvärde för peptidens topparea vid 220 nm för de tre lämpliga referenskontrollerna C (för beräkning av procentvärdet för peptidens minskning).

  — För varje använt lösningsmedel, peptidkoncentration (mM) för de tre lämpliga referenskontrollerna C.

  — För varje använt lösningsmedel, medelvärde för peptidkoncentrationen (mM) för de tre lämpliga referenskontrollerna C, SD och CV.

— För positiv kontroll:

  — Peptidens topparea vid 220 nm för varje replikat.

  — Procentvärde för peptidens minskning för varje replikat.

  — Genomsnittligt procentvärde för peptidens minskning för de tre replikaten, SD och CV.

— För varje testkemikalie:

  — Förekomst av fällning i reaktionsblandningen i slutet av inkubationstiden, i förekommande fall. Om fällningen har återlösts eller centrifugerats.

  — Förekomst av sameluering.

  — Beskrivning av andra eventuella relevanta observationer, i förekommande fall.

  — Peptidens topparea vid 220 nm för varje replikat.

  — Procentvärde för peptidens minskning för varje replikat.

  — Genomsnittligt procentvärde för peptidens minskning för de tre replikaten, SD och CV.

  — Genomsnittligt procentvärde för cysteinets och lysinets minskning.

  — Prediktionsmodell och DPRA-förutsägelse.

Kvalifikationsprövning

— I förekommande fall, det förfarande som använts för att visa att laboratoriet är kvalificerat för att tillämpa testmetoden (t.ex. genom testning av kvalifikationsämnen) eller för att visa att testmetoden kan reproduceras över tiden.

Diskussion av resultaten.

— Diskussion av de resultat som uppnåtts med DPRA-testmetoden.

— Diskussion av testmetodens resultat inom ramen för en IATA om annan relevant information finns tillgänglig.

Slutsats

▼M7

LITTERATUR

(1) Förenta nationerna (FN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Femte reviderade upplagan, FN New York och Genève, 2013. Finns 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 denna bilaga: Hudsensibilisering.

(4) Kapitel B.42 i denna bilaga: LLNA-metoden (Local Lymph Node Assay):

(5) Kapitel B.50 i denna bilaga: Hudsensibilisering: LLNA-metoden (Local Lymph Node Assay): DA.

(6) Kapitel B.51 i denna bilaga: Hudsensibilisering: LLNA-METODEN (Local Lymph Node Assay) BrdU-ELISA

(7) Adler m.fl. (2011). Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects-2010. Archives of Toxicology 85:367–485.

(8) Gerberick m.fl. (2004). Development of a peptide reactivity assay for screening contact allergens. Toxicological Sciences 81:332–343.

(9) Gerberick m.fl. (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. Finns på https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations/eurl-ecvam-recommendation-on-the-direct-peptide-reactivity-assay-dpra

(11) Jaworska m.fl. (2013). Bayesian integrated testing strategy to assess skin sensitization potency: from theory to practice. Journal of Applied Toxicology, publicerad online, 14 maj 2013, DOI: 10.1002/jat.2869.

(12) Bauch m.fl. (2012). Putting the parts together: combining *in vitro* methods to test for skin sensitizing potential. Regulatory Toxicology and Pharmacology 63: 489–504.

(13) Nukada m.fl. (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 m.fl. (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 och Jacobs (1936). Studies on the sensitization of animals with simple chemical compounds. Journal of Experimental Medicine 64:625–639.

(16) Dupuis och Benezra (1982). Allergic contact dermatitis to simple chemicals: a molecular approach. New York & Basel: Marcel Dekker Inc.

(17) Lepoittevin m.fl. (1998). Allergic contact dermatitis: the molecular basis. Springer, Berlin.

(18) EC EURL ECVAM (2012). Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) Validation Study Report 74pp. Finns 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 m.fl. (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) protokoll 154: Direct Peptide Reactivity assay (DPRA) for skin sensitisation testing 17pp. Finns 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, nr 34. Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling (OECD), Paris, Frankrike.

(22) FDA (Food and Drug Administration (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation 22pp. Finns 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

Tillägg 1

DEFINITIONER

Noggrannhet: Ett mått på hur väl testmetodresultaten och de godtagna referensvärdena överensstämmer med varandra. Den är ett mått på testmetodens prestanda och relevansaspekt. Detta begrepp används ofta omväxlande med ”konkordans” för att beskriva andelen korrekta resultat med en testmetod (21).

AOP (Adverse Outcome Pathway): Sekvens av händelser, från målkemikalien eller en grupp av liknande kemikalier, genom den molekylära inledande händelsen och fram till ett in vivo-resultat av intresse (2).

Kalibreringskurva: Förhållandet mellan det experimentella responsvärdet och den analytiska koncentrationen (även kallad *standardkurva*) för ett känt ämne.

Kemikalie: ett ämne eller en blandning.

Variationskoefficient: Variationsmått som beräknas för en grupp av replikatdata genom att standardavvikelsen divideras med medelvärdet. Det kan multipliceras med 100 för att uttryckas som en procentandel.

Fara: inneboende egenskap hos ett ämne eller en situation som har potential att orsaka skadliga effekter när en organism, ett system eller en (del)population exponeras för ämnet.

IATA (Integrated Approach to Testing and Assessment): Strukturerad strategi för identifiering av fara (risk), karakterisering av fara (styrka) och/eller säkerhetsbedömning (risk/styrka och exponering) för en kemikalie eller en grupp av kemikalier, som strategiskt integrerar och väger in alla relevanta data som underlag för tillsynsbeslut om potentiell fara och/eller risk, och/eller behovet av ytterligare riktad och därför minimerad testning.

Molekylär inledande händelse: Kemiskt inducerad störning i ett biologiskt system på molekylnivå, som identifieras som den utlösande händelsen i AOP.

Blandning: En blandning eller en lösning som består av två eller flera ämnen i vilken de inte reagerar (1)

Monokomponentämne: Ett ämne, definierat av sin kvantitativa sammansättning, där minst en huvudsaklig beståndsdel utgör minst 80 viktprocent.

Multikomponentämne: Ett ämne, definierat av sin kvantitativa sammansättning, där fler än en huvudsaklig beståndsdel förekommer i en koncentration på $\geq$ 10 viktprocent och $<$ 80 viktprocent. Ett multikomponentämne är resultatet av en tillverkningsprocess. Skillnaden mellan blandningar och multikomponentämnen är att en blandning erhålls genom att två eller flera ämnen blandas utan kemisk reaktion. Ett multikomponentämne är resultatet av en kemisk reaktion.

Positiv kontroll: ett replikat som innehåller testsystemets alla komponenter och behandlas med ett ämne som veterligen inducerar positiv respons. För att säkerställa att den positiva kontrollresponsens variationer kan bedömas över tiden, bör den kraftiga irritation som framkallas inte vara överdriven.

Referenskontroll: ett obehandlat prov som innehåller testsystemets alla komponenter, inbegripet lösningsmedlet eller vehikeln som behandlas tillsammans med testkemikaliebehandlade och andra kontrollprover i syfte att fastställa bakgrundsrespons för de prover som behandlas med testkemikalien upplöst

▼M7

i samma lösningsmedel eller vehikel. När detta prov testas med en parallell negativ kontroll, visar provet också huruvida lösningsmedlet eller vehikeln påverkar testsystemet.

Relevans: beskrivning av förhållandet mellan testet och den berörda effekten och huruvida detta förhållande är meningsfullt och användbart för ett visst ändamål. Relevansen är ett mått på hur väl man genom testet korrekt kan mäta och förutse den biologiska effekt det gäller. Relevans omfattar också överväganden om en testmetods noggrannhet (konkordans) (21).

Tillförlitlighet: mått på i vilken utsträckning en testmetod kan reproduceras inom och mellan laboratorier över tiden när den utförs med hjälp av samma protokoll. Tillförlitligheten bedöms genom att man beräknar reproducerbarheten inom och mellan laboratorier och repeterbarheten inom laboratorier (21).

Reproducerbarhet: Överensstämmelse mellan resultat som erhållits från testning av samma kemikalie med användning av samma testprotokoll (se tillförlitlighet) (21).

Sensitivitet: den andel av alla positiva/aktiva testkemikalier som klassificeras korrekt i testet. Det är ett mått på noggrannhet för en testmetod som ger kategoriska resultat och är en viktig faktor vid bedömningen av relevansen för en testmetod (21).

Specificitet: den andel av alla negativa/inaktiva testkemikalier som klassificeras korrekt i testet. Det är ett mått på noggrannhet för en testmetod som ger kategoriska resultat och är en viktig faktor vid bedömningen av relevansen för en testmetod (21).

Ämne: Kemiska ämnen och deras föreningar i naturlig eller framställd form, inklusive eventuella tillsatser nödvändiga för att bevara produktens stabilitet och sådana föroreningar som härrör från framställningsprocessen, men exklusive eventuella lösningsmedel som kan avskiljas utan att det påverkar ämnets stabilitet eller ändrar dess sammansättning (1).

Systemets lämplighet: Fastställande av instrumentens prestanda (t.ex. sensitivitet genom analys av en referensstandard innan analyssatsen körs (22).

Testkemikalie: Begreppet ”testkemikalie” avser de testade kemikalierna.

GHS (globalt harmoniserat system för klassificering och märkning av kemikalier: Ett system för att klassificera ämnen och blandningar enligt standardiserade typer och nivåer av fysiska risker, hälsorisker och miljörisker och informera om resultaten genom t.ex. piktogram, signalord, faroangivelser, skyddsangivelser och säkerhetsdatablad i syfte att informera om ämnenas skadliga effekter för att skydda personer (inklusive arbetsgivare, arbetstagare, transportörer, konsumenter och personal inom räddningstjänsten) och miljön (1).

UVCB-ämne: ämne med okänd eller varierande sammansättning, komplexa reaktionsprodukter och biologiskt material.

Giltig testmetod: En testmetod som anses vara tillräckligt relevant och tillförlitlig för ett särskilt ändamål och baserar sig på vetenskapligt sunda principer. En testmetod är aldrig giltig i absolut bemärkelse, utan endast i förhållande till ett fastställt ändamål (21).

▼M7

Tillägg 2

KVALIFIKATIONSÄMNEN FÖR ICE-TESTMETODEN

Chemico Hud Sensibilisering: Direkt Peptid Reaktivitetsanalys

Före rutinanvändning av ett test som följer denna testmetod bör laboratoriet påvisa den tekniska kvaliteten genom att korrekt identifiera klassificeringen av kemikalier som är farliga för ögonen för de 13 kemikalier som rekommenderas i tabell 1. Dessa ämnen har valts ut att representera responsskalan för ämnen som är farliga för ögonen enligt resultaten från in vivo-test på kaninögon (TG 405) och FN:s GHS-klassificieringssystem (dvs. GHS-kategorierna 1, 2A, 2B eller ingen klassificering) (4)(6). Till övriga kriterier hör att ämnena ska vara kommersiellt tillgängliga, att det finns tillgång till in vivo-referensdata av hög kvalitet och att det finns data av hög kvalitet från ICE-testmetoden in vitro. Referensdata finns i SSD (5) och i ICCVAM Background Review Document för ICE-testmetoden (9).

Tabell 1

Rekommenderade kvalifikationsämnen för att påvisa teknisk kvalitet med DPRA

Kvalifikationsämnen	CASRN	Fysisk form	In vivo-förutsägelse ([1])	DPRA-förutsägelse ([2])	Intervall ([3]) för % minskning av cysteinpeptider	Intervall ([3]) för % lysinpeptider minskning
2,4-Dinitroklorbensen	97-00-7	Fast ämne	Sensibiliserande (extremt)	Positiv	90–100	15–45
Oxazolon	15646-46-5	Fast ämne	Sensibiliserande (extremt)	Positiv	60–80	10–55
Formaldehyd	50–00–0	Vätska	Sensibiliserande (starkt)	Positiv	30–60	0–24
Bensylidenaceton	122-57-6	Fast ämne	Sensibiliserande (måttligt)	Positiv	80–100	0–7
Farnesal	19317-11-4	Vätska	Sensibiliserande (svag)	Positiv	15–55	0–25
2,3-Butandion	431-03-8	Vätska	Sensibiliserande (svagt)	Positiv	60–100	10–45
1-Butanol	71-36-3	Vätska	Icke-sensibiliserande	Negativ	0–7	0–5,5
6-Metylkumarin	92-48-8	Fast ämne	Icke-sensibiliserande	Negativ	0–7	0–5,5
Mjölksyra	50-21-5	Vätska	Icke-sensibiliserande	Negativ	0–7	0–5,5
4-Metoxiacetofenon	100-06-1	Fast ämne	Icke-sensibiliserande	Negativ	0–7	0–5,5

([1]) In vivo-förutsägelserna angående fara och (styrka) baseras på LLNA-data (19). In vivo-styrka härleds med användning av de kriterier som föreslagits av ECETOC (23).
([2]) En DPRA-förutsägelse bör övervägas inom ramen för en IATA och enligt anvisningarna i punkterna 9 och 11.
([3]) Intervallen bestäms på grundval av minst tio minskningsvärden som genererats av sex sinsemellan oberoende laboratorier.

▼M7

Tillägg 3

VÄGLEDNING OM UTFODRING OCH HANTERING AV FISKYNGEL OCH TESTDJUR FRÅN REKOMMENDERADE ARTER

Kalibreringsstandarder och referenskontroller	STD1 STD2 STD3 STD4 STD5 STD6 Utspädningsbuffert Referenskontroll A, rep 1 Referenskontroll A, rep 2 Referenskontroll A, rep 3
Samelueringskontroller	Samelueringskontroll 1 för testkemikalie 1 Samelueringskontroll 2 för testkemikalie 2
Referenskontroller	Referenskontroll B, rep 1 Referenskontroll B, rep 2 Referenskontroll B, rep 3
Första uppsättningen replikat	Referenskontroll C, rep 1 Referenskontroll C, rep 1 Prov 1, rep 1 Prov 2, rep 1
Andra uppsättningen replikat	Referenskontroll C, rep 2 Kanelaldehyd, rep 2 Prov 1, rep 2 Prov 2, rep 2
Tredje uppsättningen replikat	Referenskontroll C, rep 3 Kanelaldehyd, rep 3 Prov 1, rep 3 Prov 2, rep 3
Referenskontroller	Referenskontroll B, rep 4 Referenskontroll B, rep 5 Referenskontroll B, rep 6

Tre uppsättningar referenskontroller (dvs. prover som endast består av peptiden upplöst i lämpligt lösningsmedel) bör ingå i analyssekvensen.
Referenskontroll A: används för att kontrollera att HPLC-systemet är lämpligt.
Referenskontroll B: inbegrips i början och slutet av analyssekvensen för att kontrollera stabiliteten hos referenskontrollerna under analystiden.
Referenskontroll C: inbegrips i analyssekvensen för att kontrollera att det lösningsmedel som använts för att lösa upp testkemikalien inte påverkar procentvärdet för peptidernas minskning.

▼M7

B.60 **HUDSENSIBILISERING IN VITRO: TESTMETODEN ARE-NRF2-UCIFERAS**

INLEDNING

Denna testmetod motsvarar OECD:s testriktlinje (TG) 442D (2015). Hudsensibiliserande ämnen är ämnen som leder till en allergisk reaktion efter hudkontakt enligt definitionen i FN:s globala harmoniserade system för klassificering och märkning av kemikalier (GHS) (1) och förordning (EU) nr 1272/2008 om klassificering, märkning och förpackning av ämnen och blandningar (CLP-förordningen) ([1]). Denna testmetod utgörs av ett förfarande in vitro (testmetoden ARE-Nrf2-luciferas) som används för att skilja mellan hudsensibiliserande ämnen och icke-hudsensibiliserande ämnen enligt FN:s GHS-klassificering (1) och CLP-förordningen.

Det råder allmän enighet om de viktigaste biologiska händelserna som utlöser hudsensibilisering. Den befintliga kunskapen om de kemiska och biologiska mekanismer som är förknippade med hudsensibilisering har sammanfattats i form av AOP (Adverse Outcome Pathway) (2), från den inledande molekylära händelsen via de mellanliggande händelser som orsakar den negativa hälsoeffekten, nämligen allergisk kontaktdermatit hos människor och överkänslighet mot kontakt hos gnagare (2) (3). Den molekylära inledande händelsen är en kovalent bindning av elektrofila ämnen till nukleofila centrum i hudproteiner. Den andra nyckelhändelsen i AOP sker i keratinocyterna och inkluderar inflammationsrespons samt genuttryck i samband med specifika cellsignalerande vägar, såsom ARE-beroende vägar (antioxidant/electrophile response element). Den tredje nyckelhändelsen är aktivering av dendritiska celler, vilket vanligen bedöms genom uttryck av specifika cellytmarkörer, kemokines och cytokines. Den fjärde nyckelhändelsen är spridning av T-celler, som bedöms indirekt i murintestmetoden LLNA(4).

Bedömning av hudsensibiliteten har normalt inneburit användning av försöksdjur. I de klassiska metoderna som baseras på marsvin, Magnusson Kligman Guinea Pig Maximisation Test (GPMT) och Buehler-testet (TM B.6 (5)), undersöks både induktions- och eliciteringsfaserna i hudsensibilisering. Ett murintest, Local Lymph Node Assay (LLNA, TM B.42 (4)) och dess två icke radioaktiva modifieringar, LLNA: DA (TM B.50 (6)) och LLNA: BrdU-ELISA (TM B.51 (7)), som endast bedömer induktionsresponsen, har också vunnit erkännande eftersom de är mer fördelaktiga än marsvinstester ur djurskyddssynpunkt och ger en objektiv mätning av induktionsfasen i hudsensibilisering.

Mer nyligen har man kommit fram till att mekaniskt baserade tester in chemico och in vitro kan anses vara vetenskapligt giltiga för utvärdering av kemikaliers hudsensibiliserande faror. Det är dock nödvändigt att kombinera metoder utan försöksdjur (in silico, in chemico, in vitro) inom IATA (Integrated Approaches to Testing and Assessment) för att fullständigt ersätta de djurförsök som används i dagsläget, med tanke på AOP:s begränsade mekanistiska täckning av de testmetoder utan försöksdjur som finns tillgängliga för närvarande (2) (3).

Denna testmetod (ARE-Nrf2-luciferas) föreslås för att hantera den andra nyckelhändelsen som beskrivs i punkt 2. Hudsensibiliserande ämnen har rapporterats inducera gener som regleras av ARE (antioxidant response element) (8) (9). Små elektrofila ämnen såsom hudsensibiliserande ämnen kan agera mot sensorproteinet Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1), t.ex. genom kovalent

([1]) Europaparlamentets och rådets förordning (EG) nr 1272/2008 av den 16 december 2008 om klassificering, märkning och förpackning av ämnen och blandningar, ändring och upphävande av direktiven 67/548/EEG och 1999/45/EG samt ändring av förordning (EG) nr 1907/2006 (EUT L 353, 31.12.2008, s. 1).

▼M7

modifikation av dess cysteinrest, vilket leder till att det löser sig från transkriptionsfaktorn Nrf2 (nuclear factor-erythroid 2-related factor 2). Den upplösta Nrf2 kan därefter aktivera ARE-beroende gener, t.ex. gener som kodar för fas II avgiftande enzymer (8) (10) (11).

Det enda ARE-Nrf2-luciferas-test in vitro som för närvarande täcks av denna testmetod är KeratinoSens™-testet, för vilket valideringsstudier har slutförts (9) (12) (13), följt av en oberoende granskning som utförts av Europeiska centret för bestämning av alternativa metoder (EURL ECVAM) (14). KeratinoSens™-testet ansågs vetenskapligt giltigt för att användas som en del av en IATA i syfte att skilja mellan hudsensibiliserande ämnen och icke-hudsensibiliserande ämnen för klassificering och märkning av farliga ämnen (14). Laboratorier som vill tillämpa denna testmetod kan erhålla den rekombinanta cellinje som används i KeratinoSens™-testet genom ett licensavtal med testmetodens utvecklare (15).

Definitioner av begreppen finns i tillägg 1.

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN, TILLÄMPLIGHET OCH BEGRÄNSNINGAR

Eftersom aktiveringen av Keap1-Nrf2-ARE-vägen endast behandlar den andra nyckelhändelsen i AOP-hudsensibilisering är information från testmetoder som baseras på denna väg sannolikt inte tillräcklig om den används som enda underlag för att dra slutsatser om kemikaliers hudsensibiliserande potential. De data som genereras med denna testmetod bör därför övervägas inom ramen för integrerade strategier som IATA och kombineras med annan kompletterande information, t.ex. från in vitro-test rörande andra viktiga händelser i AOP-hudsensibiliseringen samt metoder utan testning, inklusive jämförelser från kemiskt analoga ämnen. Exempel på hur testmetoden ARE-Nrf2-luciferas kan användas i kombination med annan information finns i litteraturen (13) (16) (17) (18) (19).

Denna testmetod kan användas för att skilja mellan hudsensibiliserande kemikalier (dvs. GHS-/CLP-kategori 1) och icke-hudsensibiliserande ämnen inom ramen för IATA. Testmetoden kan inte användas fristående, vare sig för att dela in hudsensibiliserande ämnen i underkategorierna 1A och 1B enligt GHS/CLP, eller för att förutsäga styrka när det gäller säkerhetsbedömningsbeslut. Beroende på tillämpligt regelverk kan dock ett positivt resultat användas fristående för att klassificera kemikalier i GHS-/CLP-kategori 1.

Baserat på datauppsättningen från valideringsstudien samt intern testning som använts för den oberoende granskningen av testmetoden har KeratinoSens™-testet visat sig vara överförbart till laboratorier med erfarenhet av cellodlingar. Testmetodens förväntade reproducerbarhet är i storleksordningen 85 % inom och mellan laboratorier (14). Noggrannheten (77 % – 155/201), sensitiviteten (78 % – 71/91) och specificiteten (76 % – 84/110) för KeratinoSens™-testet när det gäller att skilja mellan hudsensibiliserande ämnen (dvs. GHS-/CLP-kategori 1) och icke-hudsensibiliserande ämnen jämfört med LLNA-resultat har beräknats med beaktande av all data som lämnats in till EURL ECVAM för utvärderingen och granskningen av testmetoden (14). Dessa siffror liknar nyligen publicerade siffror

▼M7

baserade på intern testning av cirka 145 ämnen (77 % noggrannhet, 79 % sensitivitet, 72 % specificitet) (13). Det är mer sannolikt att KeratinoSens™-testet underskattar kemikalier som visar en låg till måttlig hudsensibiliserande styrka (dvs. GHS-/CLP-underkategori 1B) än kemikalier som visar en hög hudsensibiliserande styrka (dvs. GHS/CLP-underkategori 1A) (13) (14). Sammantaget visar informationen att KeratinoSens™-testet bidrar till att identifiera risker för hudsensibilisering. De noggrannhetsvärden som anges här för KeratinoSens™-testet som en fristående testmetod är dock endast vägledande, eftersom testmetoden bör övervägas i kombination med andra informationskällor inom ramen för en IATA och enligt beskrivningen i punkt 9. Vid utvärderingen av testmetoder med avseende på hudsensibilisering utan djurförsök bör man dessutom tänka på att både LLNA och andra djurförsök kanske inte fullständigt avspeglar situationen för de arter som är av intresse, t.ex. människor.

I denna metod avser begreppet ”testkemikalie” endast testade kemikalier. Frågan om huruvida testmetoden ARE-Nrf2-luciferas är tillämplig på testning av ämnen och/eller blandningar tas inte upp här. De uppgifter som finns tillgängliga för närvarande visar att KeratinoSens™-testet är tillämpligt på testkemikalier som täcker en rad olika organiska funktionella grupper, reaktionsmekanismer, hudsensibiliseringsstyrkor (detta har fastställts i in vivo-undersökningar) och fysikalisk-kemiska egenskaper (9) (12) (13) (14). De ämnen som testades var främst monokomponentämnen, även om en begränsad datamängd även finns om testning av blandningar (20). Testmetoden är emellertid tekniskt tillämplig på testning av multikomponentämnen och blandningar. Innan testmetoden används på en blandning i syfte att samla in data för ett lagstadgat ändamål bör man dock överväga om, och i så fall varför, den kommer att ge godtagbara resultat för det syftet. Sådana överväganden är inte nödvändiga om blandningen måste provas enligt lag. Vid testning av multikomponentämnen eller blandningar bör man även överväga eventuella störningar av cytotoxiska beståndsdelar i de observerade responserna. Testmetoden är tillämplig på lösliga testkemikalier eller testkemikalier som bildar en stabil dispersion (dvs. en kolloid eller en lösning i vilken testkemikalien inte stabiliseras eller separeras i olika faser från lösningsmedlet), antingen i vatten eller DMSO (inklusive alla komponenter i testkemikalien vid testning av multikomponentämnen eller blandningar). Testkemikalier som inte uppfyller dessa villkor vid den högsta erforderliga slutkoncentrationen på 2 000 μM (jfr punkt 22) kan fortfarande testas vid lägre koncentrationer. I ett sådant fall kan resultat som uppfyller positivitetskriterierna i punkt 39 fortfarande användas som underlag för att identifiera testkemikalien som hudsensibiliserande. Negativa resultat vid koncentrationer på < 1 000 μM bör dock anses vara tvetydiga (se prediktionsmodellen i punkt 39). Vanliga ämnen med en LogP upp till 5 har testats med goda resultat, medan extremt hydrofoba ämnen med en LogP över 7 ligger utanför testmetodens kända tillämplighet (14). För ämnen med en LogP mellan 5 och 7 finns endast begränsad information tillgänglig.

Negativa resultat bör behandlas med försiktighet eftersom ämnen som endast reagerar på lysinrester kan detekteras som negativa av testmetoden. På grund av den begränsade metaboliska kapaciteten hos den använda cellinjen (21) och försöksbetingelserna kan även prohaptener (dvs. kemikalier som kräver enzymatisk aktivering, t.ex. via P450-enzymer) och prehaptener (dvs. kemikalier som aktiveras av autooxidation) också ge negativa resultat, särskilt om de har en låg oxidationsgrad. Testkemikalier som inte är hudsensibiliserande men ändå är kemiska stressorer kan å andra sidan leda till falska positiva resultat (14). Mycket cytotoxiska testkemikalier kan inte alltid bedömas på ett tillförlitligt sätt. Testkemikalier som har en störande inverkan på luciferasenzymet kan störa luciferasens aktivitet i cellbaserade försök, vilket antingen orsakar skenbar inhibition eller ökad luminiscens (22). Fytoöstrogenkoncentrationer som är högre än 1 μM har t.ex. rapporterats störa luminiscenssignalerna i andra försök med rapporterande luciferasgener beroende på överaktivering av luciferasreportergenen (23). Därför krävs en noggrann undersökning av luciferasuttryck som erhålls

▼M7

vid höga koncentrationer av fytoöstrogener eller liknande kemikalier som misstänkts producera en fytoöstrogenliknande överaktivering av luciferasreportergenen (23). Om det finns bevis för att testmetoden inte är tillämplig på andra specifika testkemikaliekategorier bör den inte användas för dessa kategorier.

Förutom att KeratinoSens™-testet fungerar som underlag för att skilja mellan hudsensibiliserande ämnen och icke-hudsensibiliserande ämnen ger det även information om koncentration-respons som eventuellt kan bidra till bedömning av kemikaliers sensibiliseringspotential när försöket används inom ramen för integrerade strategier som IATA (19). Ytterligare arbete, företrädesvis baserat på tillförlitliga data för människor, krävs dock för att fastställa hur resultaten från KeratinoSens™-testet kan bidra till potensgradering (24) och indelning i underkategorier av hudsensibiliserande ämnen enligt GHS/CLP.

TESTPRINCIP

Testmetoden ARE-Nrf2-luciferas använder en immortaliserad vidhäftande cellinje som härletts från mänskliga keratinocyter av typen HaCaT som stabilt transfekteras med valfri plasmid. Cellinjen innehåller luciferasgenen under transkriptionskontroll av en konstituerande promotor som fusionerats med ett ARE-element från en gen som är känd för att uppregleras av kemikalier som orsakas kontaktdermatit (25) (26). Luciferassignalen avspeglar hudsensibiliserande ämnen som aktiverar endogena Nrf2-beroende gener. Luciferassignalens beroende i den rekombinanta cellinjen på Nrf2 har påvisats (27). Detta möjliggör kvantitativ mätning (genom luminiscensdetektion) av luciferasgenens induktion, med användning av väletablerade ljusproducerande luciferassubstrat som en indikator på Nrf2-transkriptionsfaktorns aktivitet i celler efter exponering för elektrofila ämnen.

Testkemikalier anses som positiva i KeratinoSens™-testet om de orsakar en statistiskt signifikant induktion av luciferasaktiviteten över en viss gräns (dvs. > 1,5-faldig eller en ökning på 50 %), under en fastställd koncentration som inte avsevärt påverkar cellens viabilitet (dvs. under 1 000 μM och vid en koncentration där cellens viabilitet är över 70 % (9) (12)). För detta ändamål fastställs det maximala förhållandet för luciferasaktivitetens induktion på lösningsmedelskontrollen (negativ kontroll) (I_{max}). Eftersom cellerna exponeras för en rad koncentrationer av testkemikalien bör de koncentrationer som behövs för en statistiskt signifikant induktion av luciferasaktiviteten över gränsen (dvs. värdet $EC_{1,5}$) interpoleras från dos-responskurvan (se beräkningar i punkt 32). Parallella cytotoxicitetsmätningar bör dessutom göras för att bedöma huruvida induktionsnivåerna för luciferasaktiviteten förekommer vid subcytotoxiska koncentrationer.

Före rutinanvändning av ARE-Nrf2-luciferas-testet enligt denna testmetod bör laboratoriet visa teknisk kompetens med hjälp av de tio kvalifikationsämnen som anges i tillägg 2.

Prestandastandarder (PS) (28) finns tillgängliga för att underlätta valideringen av nya eller modifierade testmetoder för ARE-Nrf2-luciferas in vitro som liknar KeratinoSens™-testet, och för att möjliggöra snabba ändringar av denna testmetod för att inbegripa dessa. Ömsesidig acceptans av data (Mutual Acceptance of Data, MAD) enligt OECD-avtalet garanteras endast för testmetoder som validerats enligt PS, och om de har granskats och inbegripits i motsvarande testriktlinje av OECD.

▼M7

FÖRFARANDE

Den enda metod som för närvarande omfattas av denna testmetod är det vetenskapligt giltiga KeratinoSens™-testet (9) (12) (13) (14). Standardrutiner (SOP) för KeratinoSens™-testet finns tillgängliga och bör användas när testmetoden genomförs och används i laboratoriet (15). Laboratorier som vill tillämpa denna testmetod kan erhålla den rekombinanta cellinje som används i KeratinoSens™-testet genom ett licensavtal med testmetodens utvecklare. I de följande punkterna ges en beskrivning av de viktigaste komponenterna och förfarandena för testmetoden ARE-Nrf2-luciferas.

Beredning av keratinocytodlingarna

En transgen cellinje med en stabil insertion av luciferasreportergenen under kontroll av ARE-elementet bör användas (t.ex. cellinjen KeratinoSens™). Efter mottagandet uppförökas cellerna (t.ex. 2 till 4 passager) och lagras frysta som en enhetlig stam. Celler från denna ursprungliga stam kan uppförökas upp till ett maximalt passageantal (dvs. 25 för KeratinoSens™) och används för rutintestning med användning av lämpligt underhållsmedium (för KeratinoSens™ används DMEM med serum och Geneticin).

För testning bör cellerna vara konfluenta till 80–90 %. Det är viktigt att se till att cellerna aldrig blir helt konfluenta. Cellerna skördas en dag före testningen och fördelas till 96-hålsplattor (10 000 celler/hål för KeratinoSens™). Det är viktigt att undvika att cellerna sedimenteras under sådden för att säkerställa att ett enhetligt antal celler fördelas mellan hålen. Om antalet inte är enhetligt kan detta steg ge upphov till en stor variation mellan hålen. För varje repetition används tre replikat för mätningen av luciferasaktiviteten och ett parallellt replikat används för cellviabilitetsförsöket.

Beredning av testkemikalien och kontrollämnen

Testkemikalien och kontrollämnena bereds på testningsdagen. För KeratinoSens™-testet löses testkemikalierna upp i dimetylsulfoxid (DMSO) till slutlig önskad koncentration (t.ex. 200 mM). DMSO-lösningarna kan anses vara självsteriliserande, vilket innebär att ingen sterilfiltrering krävs. Testkemikalier som inte är lösliga i DMSO löses upp i sterilt vatten eller odlingsmedium och lösningarna steriliseras t.ex. genom filtrering. För testkemikalier som inte har en fastställd molekylärvikt (MW) bereds en stamlösning till standardkoncentration (40 mg/ml eller 4 % (w/v)) i KeratinoSens™-testet). Om andra lösningsmedel än DMSO, vatten eller odlingsmedium används bör en tillfredsställande vetenskaplig motivering anges.

Baserat på testkemikaliens DMSO-stamlösningar görs serieutspädningar med användning av DMSO för att få fram 12 huvudkoncentrationer av den kemikalie som ska testas (från 0,098 till 200 mM i KeratinoSens™-testet). För testkemikalier som inte är upplösliga i DMSO görs de utspädningar som behövs för att få fram huvudkoncentrationerna med sterilt vatten eller ett sterilt odlingsmedium. Oberoende av vilket lösningsmedel som används späds huvudkoncentrationerna därefter ut 25-faldigt till odlingsmedier som innehåller serum och används slutligen för behandling med en ytterligare fyrfaldig utspädningsfaktor så att de slutliga koncentrationerna av den testade kemikalien sträcker sig från 0,98 till 2 000 μM i KeratinoSens™-testet. Alternativa koncentrationer kan användas om det motiveras (t.ex. i händelse av cytotoxicitet eller dålig upplösningsförmåga).

Den negativa kontroll (lösningsmedel) som används i KeratinoSens™-testet är DMSO (CAS-nr 67-68-5, ≥ 99 % renhet), för vilken sex hål per platta bereds. Den negativa kontrollen genomgår samma utspädning som huvudkoncentrationerna enligt punkt 22, så att den slutliga negativa kontrollen (lösningsmedel) är 1 % och man vet att den inte påverkar cellernas viabilitet. Den ska motsvara

▼M7

samma DMSO-koncentration som testkemikalien och den positiva kontrollen. När det gäller testkemikalier som inte är lösliga i DMSO, för vilka utspädningarna görs i vatten, måste DMSO-nivån i alla hål för den slutliga testlösningen justeras till 1 %, precis som för de andra testkemikalierna och kontrollämnena.

Den positiva kontroll som används i KeratinoSens™ -testet är kanelaldehyd (CAS-nr 14371-10-9, ≥ 98 % renhet), för vilken en serie av fem huvudkoncentrationer som sträcker sig från 0,4 till 6,4 mM bereds i DMSO (från en stamlösning på 6,4 mM). De späds ut på samma sätt som huvudkoncentrationerna enligt punkt 22, så att den slutliga koncentrationen för den positiva kontrollen sträcker sig från 4 till 64 μM. Andra lämpliga positiva kontroller, som helst bör ge $EC_{1,5}$-värden i mitten av intervallet, kan användas om historiska data finns tillgängliga för att härleda jämförbara acceptanskriterier.

Applicering av testkemikalien och kontrollämnen

För varje testkemikalie och positivt kontrollämne krävs ett försök för att härleda en förutsägelse (positiv eller negativ). Försöken bör bestå av minst två oberoende repetitioner med tre replikat var (dvs. n = 6). Om resultaten för de två oberoende repetitionerna inte överensstämmer bör en tredje repetition med tre replikat utföras (dvs. n = 9). Varje oberoende repetition utförs på olika dagar med färska stamlösningar av testkemikalier och nyskördade celler. Cellerna får däremot komma från samma passage.

Efter sådd enligt beskrivningen i punkt 20 odlas cellerna i 24 timmar i 96-hålsmikrotiterplattor. Därefter avlägsnas mediet och ersätts med färskt odlingsmedium (150 μl odlingsmedium innehållande serum, men utan Geneticin för KeratinoSens™), till vilket 50 μl av den 25-faldigt utspädda testkemikalien och kontrollämnena tillsätts. Minst ett hål per platta bör lämnas tomt (inga celler och ingen behandling) för att bedöma bakgrundsvärdena.

De behandlade plattorna inkuberas sedan i cirka 48 timmar vid 37 ± 1 °C med 5 % CO_2 i KeratinoSens™-testet. Det är viktigt att undvika förångning av flyktiga testkemikalier och korskontaminering mellan hålen av testkemikalierna, t.ex. genom att täcka över plattorna med folie före inkubationen med testkemikalierna.

Mätning av luciferasaktiviteten

Följande tre faktorer är kritiska för att säkerställa lämpliga luminiscensavläsningar:

— Luminometern bör vara tillräckligt känslig.

— Plattorna bör vara tillräckligt höga för att undvika ljuskorskontaminering.

— Luciferassubstratet bör ha ett tillräckligt ljusutfall för att säkerställa tillräcklig känslighet och låg variabilitet.

Före testning bör ett kontrollförsök enligt beskrivningen i tillägg 3 utföras för att se till att dessa tre villkor är uppfyllda.

Efter 48-timmarsexponeringen med testkemikalien och kontrollämnena i KeratinoSens™-testet tvättas cellerna med fosfatbuffrad koksaltlösning och relevant lyseringsbuffert för luminiscensavläsningarna tillsätts varje hål i 20 minuter i rumstemperatur.

▼M7

Plattorna med cellyseringen placeras därefter i luminometern för avläsning. I KeratinoSens™-testet är avläsningen programmerad enligt följande: i) tillsätt luciferassubstratet till varje hål (dvs. 50 µl), ii) vänta i 1 sekund, och iii) integrera luciferasaktiviteten i 2 sekunder. Om alternativa inställningar används, t.ex. beroende på använd luminometermodell, bör detta motiveras. Dessutom kan ett glödsubstrat användas, förutsatt att kvalitetskontrollförsöket i tillägg 3 är uppfyllt.

Bedömning av cytotoxicitet

För KeratinoSens™ cellviabilitetsförsök byts mediet ut efter exponeringstiden på 48 timmar mot färskt medium som innehåller MTT (3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazoliumbromid, tiazolylblåtetrazoliumbromid, CAS-nr 298-93-1) och cellerna inkuberas i fyra timmar vid 37 °C med 5 % CO_2. Därefter avlägsnas MTT-mediet och cellerna lyseras (t.ex. genom att tillsätta 10 % SDS-lösning till varje hål) över natten. Efter skakning mäts absorptionen vid 600 nm med en fotometer.

DATA OCH RAPPORTERING

Utvärdering av data

Följande parametrar beräknas i KeratinoSens™-testet:

— Maximalt genomsnittligt induktionsförhållande avseende det värde som observerats för luciferasaktiviteten (I_{max}) vid någon koncentration av den testade kemikalien och den positiva kontrollen.

— $EC_{1,5}$-värdet, som utgör den koncentration där induktionen av luciferasaktiviteten ligger över den 1,5-faldiga gränsen (dvs. 50 % ökad luciferasaktivitet).

— Koncentrationsvärdena IC_{50} och IC_{30} för minskning av cellens viabilitet med 50 % respektive 30 %.

— Induktionsförhållandet för luciferasaktivitet beräknas med ekvation 1 och det totala maximala induktionsförhållandet (I_{max}) beräknas som genomsnittet av de individuella repetitionerna.

Ekvation 1:

$$Induktionsförhållande = \frac{(L_{sample} - L_{blank})}{(L_{solvent} - L_{blank})}$$

där

L_{sample} är luminiscensavläsningen i hålet med testkemikalien

L_{blank} är luminiscensavläsningen i hålet för blankprov, utan celler och utan behandling

$L_{solvent}$ är den genomsnittliga luminiscensavläsningen i de hål som innehåller celler och lösningsmedel(negativ kontroll)

$EC_{1,5}$ beräknas genom linjär interpolation enligt ekvation 2, och total $EC_{1,5}$ beräknas som det geometriska medelvärdet för de individuella repetitionerna.

Ekvation 2

$$EC1{,}5 = (C_b - C_a) \times \left(\frac{1{,}5 - I_\alpha}{I_b - I_\alpha}\right) + C_\alpha$$

▼M7

där

C_a är den lägsta koncentrationen i μM med > 1,5-faldig induktion

C_b är den högsta koncentrationen i μM med < 1,5-faldig induktion

I_a är induktionsförhållandet mätt vid den lägsta koncentrationen med > 1,5-faldig induktion (medelvärde för tre replikathål)

I_b är induktionsförhållandet vid den högsta koncentrationen med < 1,5-faldig induktion (medelvärde för tre replikathål)Viabilitet beräknas med ekvation 3:

Ekvation 3:

$$Viabilitet = \frac{(V_{sample} - V_{blank})}{V_{solvent} - V_{blank}} \times 100$$

där

V_{sample} är avläsningen av MTT-absorbans i hålet med testkemikalien

V_{blank} är avläsningen av MTT-absorbans i hålet för blankprov, utan celler och utan behandling

$V_{solvent}$ är den genomsnittliga avläsningen av MTT-absorbans i de hål som innehåller celler och lösningsmedel (negativ kontroll)

IC_{50} och IC_{30} beräknas genom linjär interpolation enligt ekvation 4, och totala IC_{50} och IC_{30} beräknas som det geometriska medelvärdet för de individuella repetitionerna.

Ekvation 4:

$$IC_x = (C_b - C_\alpha) \times \left(\frac{(100 - x) - V_\alpha}{V_b - V_\alpha} \right) + C_\alpha$$

där

X är minskningen uttryckt i % vid den koncentration som ska beräknas (50 och 30 för IC_{50} och IC_{30})

C_a är den lägsta koncentrationen i μM med en minskning av viabiliteten på > x %

C_b är den högsta koncentrationen i μM med en minskning av viabiliteten på < x %

V_a är % viabilitet vid den lägsta koncentrationen med en minskning av viabiliteten på > x %

v_b är % viabilitet vid den högsta koncentrationen med en minskning av viabiliteten på < x %

Statistisk signifikans beräknas för varje koncentration som visar en > 1,5-faldig induktion av luciferasaktiviteten (t.ex. genom testet two-tailed Students t-test). Luminiscensvärdena för de tre replikatproven jämförs med luminiscensvärdena i hålen med lösningsmedelskontroll (negativ kontroll) för att bestämma huruvida induktionen av luciferasaktivitet är statistiskt signifikant ($p < 0,05$). Den lägsta koncentrationen med > 1,5-faldig induktion av luciferasaktivitet är det värde som bestämmer $EC_{1,5}$-värdet. Det kontrolleras varje gång att detta värde ligger under IC_{30}-värdet, vilket visar att minskningen av cellernas viabilitet är mindre än 30 % vid det $EC_{1,5}$-värde som bestämmer koncentrationen.

▼M7

Data bör kontrolleras visuellt med hjälp av diagram. Om ingen tydlig dos-responskurva observeras, eller om den dos-responskurva som erhålls är bifasisk (gränsen på 1,5 korsas två gånger), bör försöket upprepas för att kontrollera om detta är specifikt för testkemikalien eller om det beror på en försöksartefakt. Om den bifasiska responsen är reproducerbar i ett oberoende försök bör det lägsta $EC_{1,5}$-värdet (den koncentration när gränsen på 1,5 korsas för första gången) redovisas.

I de sällsynta fall där en statistiskt icke-signifikant induktion över 1,5 gånger observeras, följt av en högre koncentration med en statistiskt signifikant induktion, anses resultaten från denna repetition endast vara giltiga och positiva om den statistiskt signifikanta induktionen över gränsen på 1,5 erhölls för en icke cytotoxisk koncentration.

För testkemikalier som ger en 1,5-faldig eller högre induktion redan vid den lägsta testkoncentrationen på 0,98 μM fastställs $EC_{1,5}$-värdet på < 0,98 genom en visuell kontroll av dos-responskurvan.

Kriterier för godkännande

Följande godkännandekriterier bör vara uppfyllda vid användning av KeratinoSens™-testet. För det första bör den induktion av luciferasaktiviteten som erhålls med den positiva kontrollen, kanelaldehyd, vara statistiskt signifikant över gränsen på 1,5 (t.ex. med användning av ett T-test) i minst en av de testade koncentrationerna (från 4 till 64 μM).

För det andra bör $EC_{1,5}$-värdet vara inom de två standardavvikelserna för testningsanläggningens historiska medelvärde (t.ex. mellan 7 μM och 30 μM baserat på valideringsdatauppsättningen), och bör uppdateras regelbundet. Den genomsnittliga induktionen i de tre replikaten för kanelaldehyd vid 64 μM bör dessutom vara mellan 2 och 8. Om det sistnämnda kriteriet inte är uppfyllt bör dos-responsen för kanelaldehyd kontrolleras noggrant och testen får endast godkännas om det finns en tydlig dos-respons med ökande induktion av luciferasaktivitet vid ökande koncentrationer för den positiva kontrollen.

Den genomsnittliga variationskoefficienten för luminiscensavläsningen för den negativa kontrollen (lösningsmedel) med DMSO bör slutligen vara under 20 % vid varje repetition som ska bestå av sex hål testade tre gånger. Om variationen är högre bör resultaten förkastas.

Tolkning av resultaten och förutsägbarhetsmodell

En förutsägelse med KeratinoSens™ anses vara positiv om alla de fyra villkor som anges nedan är uppfyllda i två av två eller i två av tre repetitioner. I annat fall anses förutsägelsen vara negativ (figur 1):

1. I_{max} är högre än (>) 1,5-faldig och skiljer sig på ett statistiskt signifikant sätt jämfört med lösningsmedelskontrollen (negativ kontroll) (fastställt genom ett tvåsidigt, oparat Students t-test);

2. Cellernas viabilitet är högre än (>) 70 % vid den lägsta koncentrationen med induktion av luciferasaktiviteten över 1,5 gånger (dvs. vid den koncentration som bestämmer $EC_{1,5}$).

3. $EC_{1,5}$-värdet är lägre än (<) 1 000 μM (eller < 200 μg/ml för testkemikalier utan definierad MW).

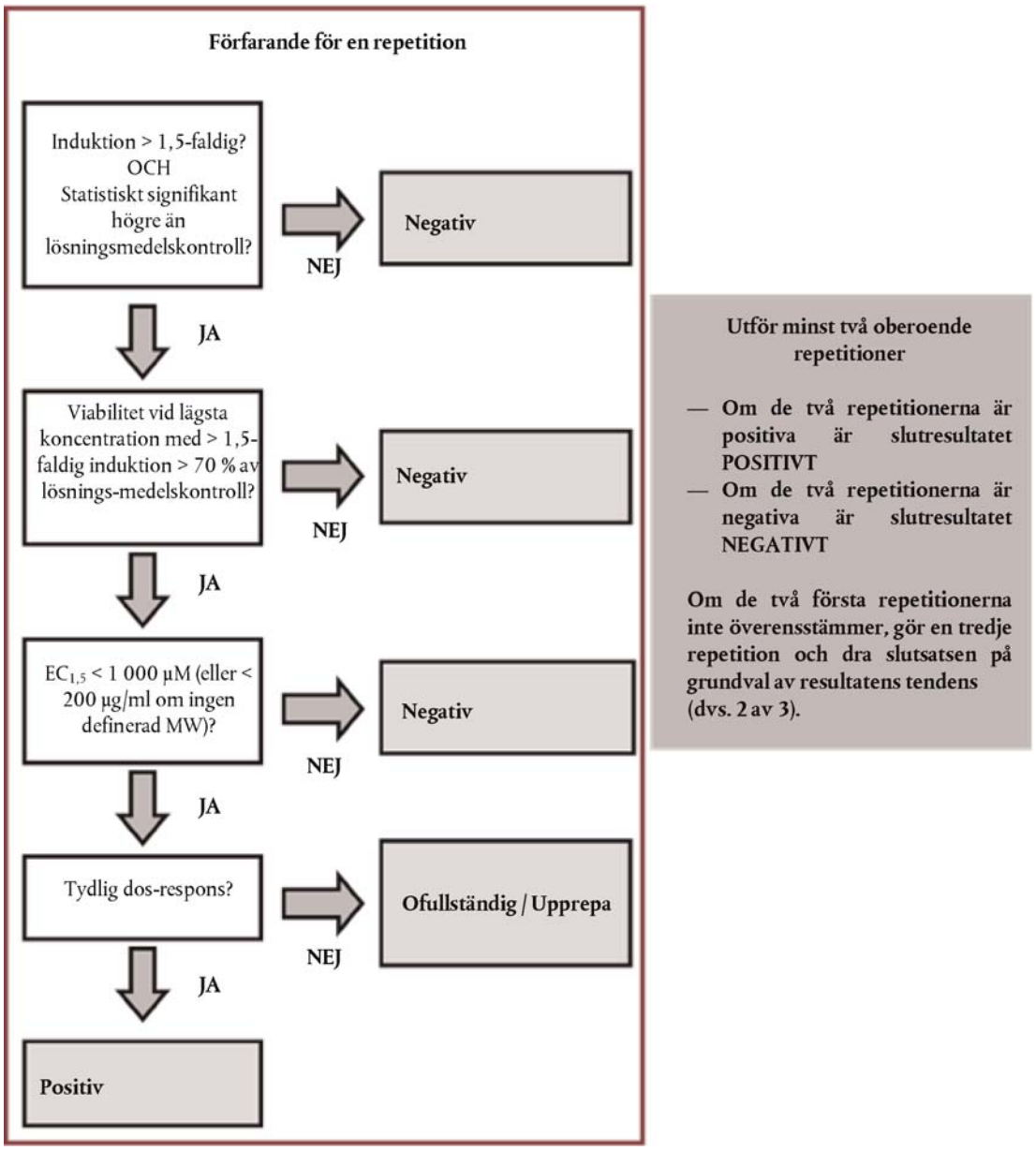
4. Det finns en uppenbar övergripande dosrespons för luciferasinduktion (eller en bifasisk respons enligt punkt 33).

▼M7

Om de tre första villkoren i en given repetition är uppfyllda men en tydlig dos-respons för luciferasinduktionen inte kan observeras bör resultatet av den repetitionen anses vara tvetydigt och ytterligare testning kan krävas (figur 1). Ett negativt resultat som erhållits med koncentrationer < 1 000 µM (eller < 200 µg/ml för testkemikalier utan definierad MW) bör också anses vara tvetydigt (se punkt 11).

Figur 1

Prediktionsmodell för KeratinoSens™-testet En KeratinoSens™-förutsägelse bör övervägas inom ramen för en IATA och enligt anvisningarna i punkterna 11 och 11.



I sällsynta fall kan testkemikalier som inducerar luciferasaktivitet som ligger mycket nära cytotoxiska nivåer vara positiva vid icke-cytotoxiska nivåer i vissa repetitioner (dvs. $EC_{1,5}$ bestämmer koncentrationer under (<) IC_{30}), och endast vid cytotoxiska nivåer i andra repetitioner (dvs. $EC_{1,5}$ bestämmer koncentrationer

▼M7

över (>) IC_{30}). Sådana testkemikalier ska testas om med en snävare dosresponsanalys med användning av en lägre utspädningsfaktor (t.ex. 1,33 eller Ö2 (= 1,41) gånger mellan hålen) för att bestämma om induktionen har uppstått vid cytotoxiska nivåer eller ej (9).

Testrapport

Testrapporten ska innehålla följande information:

Testkemikalie

— Monokomponentämne:

  — Kemisk beteckning, såsom IUPAC- eller CAS-beteckningar, CAS-nummer, SMILES- eller InChI-kod, strukturell formel och/eller andra beteckningar.

  — Fysiskt utseende, vattenlöslighet, DMSO-löslighet, molekylärvikt och ytterligare relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper, i den mån sådana uppgifter finns tillgängliga.

  — Renhet, kemisk beteckning för föroreningar i förekommande fall och när så är praktiskt möjligt.

  — Behandling före testning, om detta är tillämpligt (t.ex. uppvärmning, finfördelning).

  — Testade koncentrationer.

  — Uppgifter om lagringsförhållanden och stabilitet i den mån sådana uppgifter finns tillgängliga.

— Multikomponentämne, UVCB och blandningar:

  — Karakteriseras så långt som möjligt genom t.ex. kemisk beteckning (se ovan), renhet, kvantitativ förekomst och relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper (se ovan) hos beståndsdelarna, i den mån sådana uppgifter finns tillgängliga.

  — Fysiskt utseende, vattenlöslighet, DMSO-löslighet och ytterligare relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper, i den mån sådana uppgifter finns tillgängliga.

  — Molekylvikt eller uppskattad molekylvikt för blandning/polymerer med kända sammansättningar eller annan information som är relevant för utförandet av undersökningen.

  — Behandling före testning, om detta är tillämpligt (t.ex. uppvärmning, finfördelning).

  — Testade koncentrationer.

  — Uppgifter om lagringsförhållanden och stabilitet i den mån sådana uppgifter finns tillgängliga.

Kontroller

— Positiv kontroll

  — Kemisk beteckning, såsom IUPAC- eller CAS-beteckningar, CAS-nummer, SMILES- eller InChI-kod, strukturell formel och/eller andra beteckningar.

  — Fysiskt utseende, vattenlöslighet, DMSO-löslighet, molekylvikt och ytterligare relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper, i den mån sådana uppgifter finns tillgängliga och i förekommande fall.

  — Renhet, kemisk beteckning för föroreningar i förekommande fall och när så är praktiskt möjligt.

  — Behandling före testning, om detta är tillämpligt (t.ex. uppvärmning, finfördelning).

  — Testade koncentrationer.

  — Uppgifter om lagringsförhållanden och stabilitet i den mån sådana uppgifter finns tillgängliga.

▼M7

— Hänvisning till historiska positiva kontrollresultat som visar lämpliga acceptanskriterier för körningarna, i förekommande fall.

— Negativ kontroll (vehikel)

— Kemiska beteckningar, såsom IUPAC- eller CAS-beteckningar, CAS-nummer och/eller andra beteckningar.

— Renhet, kemisk beteckning för föroreningar i förekommande fall och när så är praktiskt möjligt.

— Fysiskt utseende, molekylvikt och ytterligare relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper om andra negativa kontroller/vehiklar än de som anges i testmetoden används, i den mån sådan information finns tillgänglig.

— Uppgifter om lagringsförhållanden och stabilitet i den mån sådana uppgifter finns tillgängliga.

— Motivering för valet av lösningsmedel för varje testkemikalie.

Testmetodens betingelser

— Namn och adress för sponsor, testanläggning och försöksledare.

— Beskrivning av testmetoden

— Cellinje, lagringsförhållanden och källa (t.ex. den anläggning de erhölls från).

— Antal passager och konfluensgrad för de celler som använts för testningen.

— Cellräkningsmetod för sådd före testning samt vidtagna åtgärder för att säkerställa en enhetlig fördelning av celler (jfr punkt 20).

— Luminometer (t.ex. modell), inklusive instrumentinställningar, använt luciferassubstrat och en demonstration av lämpliga luminiscensmätningar baserat på det kontrolltest som beskrivs i tillägg 3.

— Det förfarande som använts för att visa att laboratoriet är kvalificerat för att tillämpa testmetoden (t.ex. genom testning av kvalifikationsämnen) eller för att visa att testmetoden kan reproduceras över tiden.

Provningsförfarande

— Antal repetitioner och replikat

— Testkemikaliens koncentrationer, appliceringsförfarande samt exponeringstid (om den skiljer sig från den rekommenderade tiden).

— Beskrivning av utvärderings- och beslutskriterierna.

— Beskrivning av acceptanskriterierna för undersökningen.

— Beskrivning av eventuella modifieringar av försöksförfarandet.

Resultat

— En sammanställning av de värden för I_{max}, $EC_{1,5}$ och viabilitet (dvs. IC_{50}, IC_{30}) som erhållits för testkemikalien och den positiva kontrollen för varje repetition och medelvärden (I_{max}: genomsnitt, $EC_{1,5}$ och viabilitetsvärden: geometriskt medelvärde) samt beräknad SD med användning av data från alla individuella repetitioner och en indikation på klassificeringen av testkemikalien enligt prediktionsmodellen.

▼M7

— Den variationskoefficient som erhållits från luminiscensavlästningarna för den negativa kontrollen för varje försök.

— Ett diagram som visar dos-responskurvorna för induktionen av luciferasaktivitet samt viabilitet.

— Beskrivning av andra eventuella relevanta observationer, i förekommande fall.

Diskussion av resultaten.

— Diskussion av de resultat som uppnåtts med KeratinoSens™-testet.

— Övervägande av testmetodens resultat inom ramen för en IATA om annan relevant information finns tillgänglig.

Slutsats

LITTERATUR

(1) Förenta nationerna (FN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), femte reviderade utgåvan, FN New York och Genève, 2013. Finns på webbplatsen 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 nr 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 denna bilaga: Hudsensibilisering: LLNA-metoden (Local Lymph Node Assay).

(5) Kapitel B.6 i denna bilaga: Hudsensibilisering.

(6) Kapitel B.50 i denna bilaga: Hudsensibilisering: LLNA-METODEN (Local Lymph Node Assay): DA.

(7) Kapitel B.51 i denna bilaga: Hudsensibilisering: LLNA-METODEN (Local Lymph Node Assay): 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;:398–408.

(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, s. 42 ff. Finns 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. Finns 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 N0 213, OECD, Paris.

(29) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Environment, Health and Safety publications, Series on Testing and Assessment No.34. OECD, Paris, Frankrike.

(30) Nafta (Nordamerikanska frihandelsavtalet) (2012). Technical Working Group on Pesticides – (Quantitative) Structure Activity Relationship ((Q)SAR) Guidance Document. s. 186 ff. http://www.epa.gov/oppfead1/international/naftatwg/guidance/qsar-guidance.pdf

▼M7

Tillägg 1

DEFINITIONER

Noggrannhet: Ett mått på hur väl testmetodresultaten och de godtagna referensvärdena överensstämmer med varandra. Den är ett mått på testmetodens prestanda och relevansaspekt. Detta begrepp används ofta omväxlande med ”konkordans” för att beskriva andelen korrekta resultat med en testmetod (29).

AOP (Adverse Outcome Pathway): Sekvens av händelser, från målkemikalien eller en grupp av liknande kemikalier, genom den molekylära inledande händelsen och fram till ett in vivo-resultat av intresse (2).

ARE: *Antioxidant response element* (även kallat *EpRE*, *electrophile response element*), är ett responselement i den övre promoterregionen för många cytoprotektiva gener och fas II-gener. När ARE aktiveras av Nfr2 tjänar det som förbindelseled mellan dessa geners transkriptiva induktion.

Kemikalie: ett ämne eller en blandning.

Variationskoefficient: Variationsmått som beräknas för en grupp av replikatdata genom att standardavvikelsen divideras med medelvärdet. Det kan multipliceras med 100 för att uttryckas som en procentandel.

$EC_{1,5}$: interpolerad koncentration för en 1,5-faldig luciferasinduktion.

IC_{30}: en koncentration som framkallar en minskning av cellens viabilitet med 30 %.

IC_{50}: en koncentration som framkallar en minskning av cellens viabilitet med 50 %.

Fara: inneboende egenskap hos ett ämne eller en situation som har potential att orsaka skadliga effekter när en organism, ett system eller en (del)population exponeras för ämnet.

IATA (Integrated Approach to Testing and Assessment): Strukturerad strategi för identifiering av fara (risk), karakterisering av fara (styrka) och/eller säkerhetsbedömning (risk/styrka och exponering) för en kemikalie eller en grupp av kemikalier, som strategiskt integrerar och väger in alla relevanta data som underlag för tillsynsbeslut om potentiell fara och/eller risk, och/eller behovet av ytterligare riktad och därför minimerad testning.

I_{max}: maximal induktionsfaktor för luciferasaktivitet jämfört med lösningsmedelskontrollen (negativ kontroll) mätt vid en testkemikaliekoncentration.

Keap1: *Kelch-like ECH-associated protein 1*, ett sensorprotein som kan reglera Nrf2-aktiviteten. Under icke-inducerade förhållanden riktar Keap1-sensorproteinet in sig på Nrf2-transkriptionsfaktorn för ubikvitinering och proteolytisk nedbrytning i proteasomen. Kovalent modifiering av de reaktiva cysteinresterna i Keap 1 av små molekyler kan leda till att Nrf2 löser sig från Keap1 (8) (10) (11).

Blandning: En blandning eller en lösning som består av två eller flera ämnen i vilken de inte reagerar (1)

▼M7

Monokomponentämne: Ett ämne, definierat av sin kvantitativa sammansättning, där minst en huvudsaklig beståndsdel utgör minst 80 viktprocent.

Multikomponentämne: Ett ämne, definierat av sin kvantitativa sammansättning, där fler än en huvudsaklig beståndsdel förekommer i en koncentration på ≥ 10 viktprocent och < 80 viktprocent. Ett multikomponentämne är resultatet av en tillverkningsprocess. Skillnaden mellan blandningar och multikomponentämnen är att en blandning erhålls genom att två eller flera ämnen blandas utan kemisk reaktion. Ett multikomponentämne är resultatet av en kemisk reaktion.

Nrf2: Nuklelär faktor *(erythroid-derived 2)-like 2*, är en transkriptionsfaktor i antioxidantresponsens väg. När Nrf2 inte är ubikvitinerad byggs den upp i cytoplasman och translokerar in i kärnorna, där den kombineras till ARE i den övre promoterregionen hos många cytoprotektiva gener och initierar deras transkription (8) (10) (11).

Positiv kontroll: ett replikat som innehåller testsystemets alla komponenter och behandlas med ett ämne som veterligen inducerar positiv respons. För att säkerställa att den positiva kontrollresponsens variationer kan bedömas över tiden, bör den kraftiga irritation som framkallas inte vara överdriven.

Relevans: beskrivning av förhållandet mellan testet och den berörda effekten och huruvida detta förhållande är meningsfullt och användbart för ett visst ändamål. Relevansen är ett mått på hur väl man genom testet korrekt kan mäta och förutse den biologiska effekt det gäller. Relevans omfattar också överväganden om en testmetods noggrannhet (konkordans) (29).

Tillförlitlighet: mått på i vilken utsträckning en testmetod kan reproduceras inom och mellan laboratorier över tiden när den utförs med hjälp av samma protokoll. Tillförlitligheten bedöms genom att man beräknar reproducerbarheten inom och mellan laboratorier och repeterbarheten inom laboratorier (29).

Reproducerbarhet: Överensstämmelse mellan resultat som erhållits från testning av samma kemikalie med användning av samma testprotokoll (se tillförlitlighet) (29).

Sensitivitet: den andel av alla positiva/aktiva testkemikalier som klassificeras korrekt i testmetoden. Det är ett mått på noggrannhet för en testmetod som ger kategoriska resultat och är en viktig faktor vid bedömningen av relevansen för en testmetod (29).

Lösningsmedels-/vehikelkontroll: ett replikat som innehåller alla komponenter i testsystemet utom testkemikalien, men med det använda lösningsmedlet. Den används för att fastställa grundvärdet för de prover som behandlas med testkemikalien upplöst i samma lösningsmedel.

Specificitet: den andel av alla negativa/inaktiva testkemikalier som klassificeras korrekt i testmetoden. Den är ett mått på noggrannhet för en testmetod som ger kategoriska resultat och är en viktig faktor vid bedömningen av relevansen för en testmetod (29).

Ämne: Kemiska ämnen och deras föreningar i naturlig eller framställd form, inklusive eventuella tillsatser nödvändiga för att bevara produktens stabilitet och sådana föroreningar som härrör från framställningsprocessen, men exklusive eventuella lösningsmedel som kan avskiljas utan att det påverkar ämnets stabilitet eller ändrar dess sammansättning (1).

Testkemikalie: Begreppet ”testkemikalie” avser de testade kemikalierna.

▼M7

GHS (globalt harmoniserat system för klassificering och märkning av kemikalier: Ett system för att klassificera ämnen och blandningar enligt standardiserade typer och nivåer av fysiska risker, hälsorisker och miljörisker och informera om resultaten genom t.ex. piktogram, signalord, faroangivelser, skyddsangivelser och säkerhetsdatablad i syfte att informera om ämnenas skadliga effekter för att skydda personer (inklusive arbetsgivare, arbetstagare, transportörer, konsumenter och personal inom räddningstjänsten) och miljön (1).

UVCB-ämne: ämne med okänd eller varierande sammansättning, komplexa reaktionsprodukter och biologiskt material.

Giltig testmetod: En testmetod som anses vara tillräckligt relevant och tillförlitlig för ett särskilt ändamål och baserar sig på vetenskapligt sunda principer. En testmetod är aldrig giltig i absolut bemärkelse, utan endast i förhållande till ett fastställt ändamål (29).

▼M7

Tillägg 2

KVALIFIKATIONSÄMNEN

Hudsensibilisering in vitro: Testmetoden ARE-Nrf2-luciferas

Före rutinanvändning av denna testmetod bör laboratoriet påvisa den tekniska kvaliteten genom att korrekt erhålla den förväntade KeratinoSens™-prediktionen för de tio kvalifikationsämnen som rekommenderas i tabell 1 och genom att erhålla minskningsvärden för $EC_{1,5}$ och IC_{50} som håller sig inom respektive referensintervall för minst åtta av de tio kvalifikationsämnena. Dessa kvalifikationsämnen har valts för att representera responsintervallet för hudsensibiliserande faror. Andra urvalskriterier är kommersiell tillgänglighet, tillgång till in vivo-referenser av hög kvalitet och tillgång till in vitro-data av hög kvalitet från KeratinoSens™-testet.

Tabell 1

Rekommenderade ämnen för att påvisa teknisk kvalitet hos försöket KeratinoSens™

Kvalifikationsämnen	CASRN	Fysikalisk form	In vivo-förutsägelse (1)	KeratinoSens™ Förutsägelse (2)	$EC_{1,5}$ (μM) referensintervall (3)	IC_{50} (μM) referensintervall (3)
Isopropanol	67-63-0	Vätska	Ej sensibiliserande	Negativ	> 1 000	> 1 000
Salicylsyra	69-72-7	Fast ämne	Ej sensibiliserande	Negativ	> 1 000	> 1 000
Mjölksyra	50-21-5	Vätska	Ej sensibiliserande	Negativ	> 1 000	> 1 000
Glycerol	56-81-5	Vätska	Ej sensibiliserande	Negativ	> 1 000	> 1 000
Kanelalkohol	104-54-1	Fast ämne	Sensibiliserande (svagt)	Positiv	25–175	> 1 000
Etylenglykoldimetakrylat	97-90-5	Vätska	Sensibiliserande (svagt)	Positiv	[5–125]	500
2-merkaptobensotiazol	149-30-4	Fast ämne	Sensibiliserande (moderat)	Positiv	25–250	> 500
Metyldibromglutaronitril	35691-65-7	Fast ämne	Sensibiliserande (starkt)	Positiv	< 20	20–100
4-metylaminofenolsulfat	55-55-0	Fast ämne	Sensibiliserande (starkt)	Positiv	< 12.5	20–200
2,4-dinitro-klorbensen	97-00-7	Fast ämne	Sensibiliserande (extremt)	Positiv	< 12.5	5–20

(1) In vivo-förutsägelserna angående fara (och potential) baseras på LLNA-data (13). In vivo-kraft härleds med användning av de kriterier som föreslagits av ECETOC (24).
(2) En KeratinoSens™-förutsägelse bör övervägas inom ramen för en IATA och enligt anvisningarna i punkterna 9 och 11 i denna testmetod.
(3) Baserat på historiska observerade värden (12).

▼M7

Tillägg 3

KVALITETSKONTROLL FÖR LUMINISCENSMÄTNING

Grundläggande försök för att säkerställa optimala luminiscensmätningar i KeratinoSens™-testet

Följande tre parametrar är kritiska för att se till att tillförlitliga resultat erhålls med luminometern:

— Tillräcklig känslighet som ger en stabil bakgrund i kontrollhålen.

— Ingen gradient över plattan till följd av långa avläsningsperioder.

— Ingen ljusförorening i närliggande hål från starkt aktiva hål.

Innan testningen inleds bör man ha lämpliga luminiscensmätningar, genom att testa en konfiguration för kontrollplattan enligt beskrivningen nedan (tredubbel analys).

Konfiguration för plattan vid första övningsförsöket

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
B	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
C	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
D	**EGDMA 0,98**	**EGDMA 1,95**	**EGDMA 3,9**	**EGDMA 7,8**	**EGDMA 15,6**	**EGDMA 31,25**	**EGDMA 62,5**	**EGDMA 125**	**EGDMA 250**	**EGDMA 500**	**EGDMA 1000**	**EGDMA 2000**
E	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
F	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
G	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
H	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	**CA 4**	**CA 8**	**CA 16**	**CA 32**	**CA 64**	**Blank-prov**

EGDMA = etylenglykoldimetakrylat (CAS-nr: 97-90-5) en starkt inducerande kemikalie

CA = kanelaldehyd, positiv referens (CAS-nr: 104-55-2

Kvalitetskontrollanalysen bör visa följande:

— En tydlig dos-respons i rad D, med I_{max} > 20-faldig över bakgrunden (i de flesta fall nås I_{max}-värden mellan 100 och 300).

— Ingen dos-respons i raderna C och E (inget induktionsvärde över 1,5 (helst inte över 1,3) på grund av eventuell ljusförorening, särskilt nära starkt aktiva hål i EGDMA-raden.

— Ingen statistiskt signifikant skillnad mellan raderna A, B, C, E, F och G (dvs. ingen gradient över plattan).

— Variation i någon av raderna A, B, C, E, F och G, DMSO-hålen i rad H bör vara under 20 % (dvs. stabil bakgrund).

▼M7

B.61 TESTMETODEN FLUORESCEINLÄCKAGE FÖR IDENTIFIERING AV ÄMNEN SOM ÄR FRÄTANDE OCH KRAFTIGT IRRITERANDE FÖR ÖGONEN

INLEDNING

Denna testmetod motsvarar OECD:s testriktlinje (TG) 460 (2012). Testmetoden fluoresceinläckage (FL) är en testmetod in vitro som kan användas under särskilda omständigheter och med specifika begränsningar för att klassificera kemikalier (ämnen och blandningar) som frätande och kraftigt irriterande för ögonen enligt definitionen i FN:s globala harmoniserade system för klassificering och märkning av kemikalier (GHS) (kategori 1), förordning (EG) nr 1272/2008 om klassificering, märkning och förpackning av ämnen och blandningar (CLP-förordningen) ([1]) (kategori 1) och amerikanska Environmental Protection Agency (EPA) (kategori I) (1)(2). Vid tillämpningen av denna testmetod definieras kraftigt ögonirriterande kemikalier som kemikalier som kan orsaka vävnadsskada i ögat efter tillförsel som inte är reversibel inom 21 dagar eller allvarliga synförsämringar. Kemikalier som är frätande orsakar irreversibla vävnadsskador i ögat. Dessa kemikalier klassificeras som GHS-kategori 1, CLP-kategori 1 eller EPA-kategori I.

Även om FL-testmetoden inte anses vara en fullgod ersättning för in vivo-ögontest på kanin, rekommenderas testmetoden som en del av en strategi för stegvis testning när det gäller rättslig klassificering och märkning. FL-testmetoden rekommenderas som ett inledande steg inom ramen för en uppifrån och ned-strategi för att identifiera frätande/kraftigt irriterande kemikalier, särskilt för begränsade typer av kemikalier (dvs. vattenlösliga ämnen och blandningar) (3)(4).

Det är allmänt vedertaget att inget ögonirritationstest in vitro inom överskådlig framtid kommer att kunna ersätta ögontext in vivo (TM B.5 (5)) för att förutsäga alla typer av ögonirritation för olika kemiska klasser. Strategiska kombinationer av flera alternativa testmetoder inom ramen för en (differentierad) teststrategi kan dock ersätta ögontest in vivo (4). Uppifrån och ned-strategin (4) är utformad för att användas när en kemikalier, baserat på befintlig information, förväntas ha en hög irritationspotential.

Baserat på den prediktionsmodell som anges i punkt 35 kan FL-testmetoden identifiera kemikalier med begränsat tillämpningsområde som frätande/kraftigt irriterande för ögonen (GHS-kategori 1, CLP-kategori 1 och EPA-kategori I) utan ytterligare testning. Detsamma antas för blandningar, även om blandningar inte användes i valideringen. FL-testmetoden kan därför användas för att bestämma hur irriterande/frätande kemikalier är för ögonen enligt den stegvisa teststrategin i TM B.5 (5). En kemikalie som inte förutsägs vara frätande eller kraftigt irriterande enligt FL-testmetoden måste dock testas enligt en eller flera kompletterande testmetoder (in vitro och/eller in vivo) som gör det möjligt att

([1]) Europaparlamentets och rådets förordning (EG) nr 1272/2008 av den 16 december 2008 om klassificering, märkning och förpackning av ämnen och blandningar, ändring och upphävande av direktiven 67/548/EEG och 1999/45/EG samt ändring av förordning (EG) nr 1907/2006 (EUT L 353, 31.12.2008, s. 1).

▼M7

exakt identifiera i) kemikalier som in vitro ger en falsk negativ respons som frätande/kraftigt irriterande enligt FL (GHS-kategori 1, CLP-kategori 1 och EPA-kategori I), ii) kemikalier som inte är klassificerade som frätande/irriterande (GHS Ingen klassificering, CLP Ingen klassificering och EPA-kategori IV), och/eller iii) kemikalier som är måttligt/milt irriterande (GHS-kategorierna 2A och 2B, CLP-kategori 2 och EPA-kategorierna II och III).

Syftet är att beskriva de metoder som används för att utvärdera en testkemikalies potentiellt frätande eller kraftigt irriterande egenskaper på ögon, uppmätta som dess förmåga att orsaka skada på ett impermeabelt konfluent monolager av epitelceller. Opåverkad permeabilitet är en viktig epitelfunktion, t.ex. i ögats bindhinna (konjunktiva) och hornhinnan. Epitelets permeabilitet begränsas genom s.k. täta fogar (tight junctions). Ökad permeabilitet i hornhinnans epitel in vivo kan korreleras med den grad av inflammation och ytskador som observeras när ögonirritationen utvecklas.

I FL-testmetoden mäts toxiska effekter efter en kort tids exponering för testkemikalien i form av en ökning av permeabiliteten hos natriumfluorescein genom epitel-monolagret hos MDCK-celler (Madin-Darby Canine Kidney) som odlas på permeabla insatser. Den mängd fluoresceinläckage som uppstår är proportionell mot den kemiskt inducerade skadan på de täta fogarna, de desmosomala fogarna och cellmembranen, och kan användas för att uppskatta en testkemikalies toxiska potential. I tillägg 1 finns ett diagram över MDCK-celler som odlats på ett insatsmembran för FL-testmetoden.

Definitioner av begreppen finns i tillägg 2.

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN OCH BEGRÄNSNINGAR

Testmetoden baserar sig på INVITTOX-protokoll nr 71 (6) som har utvärderats i en internationell valideringsstudie av Europeiska centret för bestämning av alternativa metoder (ECVAM) i samarbete med amerikanska ICCVAM (*Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods*) och det japanska centret för validering av alternativa metoder (JaCVAM).

FL-testmetoden rekommenderas inte för identifiering av kemikalier som bör klassificeras som milt/måttligt irriterande eller kemikalier som inte bör klassificeras som ögonirriterande (ämnen och blandningar) dvs. GHS-kategori 2A/2B, Ingen klassificering, CLP-kategori 2, Ingen klassificering och EPA-kategori II/III/IV), vilket har påvisats av valideringsstudien (3) (7).

Testmetoden är endast tillämplig på vattenlösliga kemikalier (ämnen och blandningar). Kraftigt ögonirriterande potential hos vattenlösliga kemikalier och/eller kemikalier vars toxiska effekt inte påverkas av utspädning kan generellt förutsägas korrekt med användning av FL-testmetoden (7). För att en kemikalie ska kategoriseras som vattenlösning bör den, under försöksbetingelser, vara löslig i steril kalciumhaltig HBSS (Hanks Balanced Salt Solution) (vid en koncentration på 1,0–1,8 mM), utan fenolrött, vid en koncentration på $\geq$ 250 mg/ml (en dos över gränsdosen på 100 mg/ml). Om testkemikalien är löslig under 100 mg/ml, men framkallar en FL-induktion på 20 % redan vid den koncentrationen (dvs. FL20 < 100 mg/ml), kan den fortfarande kategoriseras som GHS-kategori 1 eller EPA-kategori I.

De identifierade begränsningarna hos denna testmetod utesluter starka syror och baser, cellfixativ och starkt flyktiga kemikalier från tillämpningsområdet. Sådana kemikalier har mekanismer som inte mäts av FL-testmetoden, t.ex. omfattande koagulering, förtvålning eller specifika reaktiva kemiska egenskaper. Andra identifierade begränsningar hos metoden baseras på resultaten för färgade och viskösa testkemikaliers prediktionsförmåga (7). Båda typerna av kemikalier anses vara

▼M7

svåra att avlägsna från monolagret efter den korta exponeringsperioden. Testmetodens prediktivitet skulle därför kunna förbättras om fler tvättningssteg används. Fasta kemikalier som löses upp i vätska har en benägenhet att fällas ut och det kan vara svårt att bestämma den slutliga koncentrationen till cellerna. När kemikalier från dessa kemiska och fysikaliska klasser utesluts ur databasen får man en klart bättre noggrannhet för FL i EU-, EPA- och GHS-klassificeringssystemen (7).

Om man ser till syftet med detta test (dvs. att enbart identifiera ämnen som är frätande eller kraftigt irriterande för ögonen) är falska negativa värden (se punkt 13) inte kritiska, eftersom sådana kemikalier därefter testas med andra tillbörligt validerade in vitro-test eller på kaniner, beroende på kraven i tillämpliga bestämmelser, med tillämpning av en strategi med stegvis testning och enligt principen om sammanvägd bedömning (5) (se även punkterna 3 och 4).

Andra identifierade begränsningar hos FL-testmetoden baseras på falska negativa och falska positiva värden. När FL-metoden används inom ramen för en uppifrån och ned-strategi för att identifiera vattenlösliga ämnen och blandningar som är frätande/kraftigt irriterande för ögonen (GHS-kategori 1, CLP-kategori 1 och EPA-kategori I) sträcker sig de falska positiva värdena för FL-testmetoden från 7 % (7/103, GHS och CLP) till 9 % (9/99, EPA) och de falska värdena från 54 % (15/28, EPA) till 56 % (27/48, GHS och CPL) jämfört med in vivo-resultat. Kemikaliegrupper som visar falska positiva och/eller falska negativa resultat i FL-testmetoden definieras inte här.

Vissa tekniska begränsningar är specifika för MDCK-cellkulturen. De täta fogar som blockerar passagen för natriumfluoresceinfärgen genom monolagret blir alltmer utsatta när cellpassageantalet ökar. Ofullständig information om täta fogar leder till ökad FL i den icke-behandlade kontrollen. Därför är det viktigt att fastställa ett maximalt godtagbart läckage i den icke-behandlande kontrollen (se punkt 38: 0 % läckage). Precis som för alla in vitro-test kan cellerna transformeras med tiden. Därför är det viktigt att ange passageintervall för försöken.

Det gällande tillämpningsområdet kan utökas i vissa fall, dock endast efter en analys av en expanderad datauppsättning av undersökta testkemikalier, företrädesvis inhämtad genom testning (3). Denna testmetod kommer att uppdateras allteftersom ny information och data övervägs.

Laboratorier som tar denna testmetod i bruk för första gången bör använda de kvalifikationskemikalier som förtecknas i tillägg 3. Laboratorierna kan använda dessa kemikalier för att påvisa sin tekniska kompetens att genomföra FL-test innan det lämnar in FL-testdata avsedda för lagstadgad faroklassificering.

TESTPRINCIP

FL-testmetoden är ett in vitro-test som baseras på cytotoxicitet och cellfunktioner. Det utförs på ett konfluent monolager av tubulära epitelceller av typen MDCK CB997, som odlas på halvgenomträngliga insatser för att återskapa ett icke-spridande tillstånd hos hornhinnans epitel in vivo. MDCK-cellinjen är väletablerad och bildar täta fogar och desmosomala fogar som liknar de fogar som finns på den apikala sidan av bindhinnans och hornhinnans epitel. Täta fogar och desmosomala fogar in vivo förhindrar att lösningar och främmande material penetrerar hornhinnans epitel. Förlust av impermeabilitet hos epitel på grund av skadade täta fogar (tight junctions) och desmosomala fogar är en av de tidiga händelserna i kemiskt inducerad ögonirritation.

▼M7

Testkemikalien appliceras på ett konfluent cellager som odlas på den apikala sidan av insatsen. En kort exponeringstid på 1 minut används rutinmässigt för att avspegla normal minskningshastighet vid human exponering. En fördel med den korta exponeringsperioden är att vattenbaserade ämnen och blandningar kan testas rena om de är lätta att avlägsna efter exponeringsperioden. Detta möjliggör mer direkta jämförelser av resultaten med de kemiska effekterna på människor. Därefter avlägsnas testkemikalien och en icke-toxisk starkt fluorescerande natriumfluoresceinfärg appliceras på den apikala sidan av monolagret i 30 minuter. Den skada testkemikalien orsakar på de täta fogarna bestäms av den mängd fluorescein som läcker igenom cellagret under en viss period.

Mängden natriumfluoresceinfärg som passerar genom monolagret och insatsmembranet till en fast volym av lösning i hålet (som natriumfluoresceinfärgen läcker in i) bestäms genom en spektrofluorometrisk mätning av fluoresceinkoncentrationen i hålet. Mängden flouresceinläckage (FL) beräknas med hänsyn till avläsningar av fluorescensintensiteten (FI) från två kontroller: en blankkontroll och en kontroll av maximalt läckage. Procentandelen läckage och därför graden av skada på de täta fogarna uttrycks, i förhållande till dessa kontroller, för varje uppsättning koncentrationer av testkemikalien. Därefter beräknas FL_{20} (dvs. den koncentration som orsakar 20 % FL i förhållande till det värde som registrerats för det obehandlade konfluenta monolagret och insatser utan celler). FL_{20}-värdet (mg/ml) används i prediktionsmodellen för att identifiera frätande och kraftigt irriterande kemikalier (se punkt 35).

Återhämtning är en viktig del av testkemikaliens toxicitetsprofil, vilket också bedöms genom ögonirritationstest in vivo. Preliminära analyser har visat att återhämtningsdata (upp till 72 timmar efter kemisk exponering) eventuellt kan öka prediktionsförmåganför INVITTOX protokoll 71. Ytterligare utvärderingar är dock nödvändiga och det skulle därför behövas kompletterande data, företrädesvis från ytterligare testning (6). Denna testmetod kommer att uppdateras allteftersom ny information och data övervägs.

FÖRFARANDE

Beredning av cellmonolager

Monolagret för MDCK CB997-cellerna bereds med nästan konfluenta celler som odlas i cellodlingskolvar i DMEM/näringsmix F12 (1 × koncentrat med L-glutamin, 15 mM HEPES, kalcium (vid en koncentration på 1,0–1,8 mM) och 10 % värmeinaktiverat FCS/FBS). Det är viktigt att alla medier/lösningar som används i FL-testet innehåller kalcium vid en koncentration på mellan 1,8 mM (200 mg/l) och 1,0 mM (111 mg/l) för att se till att täta fogar bildas och för att säkerställa deras integritet. Cellpassageantalet bör kontrolleras för att se till att täta fogar bildas på ett enhetligt och reproducerbart sätt. Cellerna bör företrädesvis hålla sig inom passageintervallet 3–30 från upptining eftersom celler inom detta passageintervall har liknande funktionalitet, vilket gör det lättare att reproducera försöksresultaten.

Innan FL-testmetoden utförs lösgör man cellerna från kolven med trypsinering och centrifugering. Därefter sås en lämplig mängd celler i insatser som är placerade i 24-hålsplattor (se tillägg 1). Insatser med 12 mm diameter och ett membran av blandade cellulosaestrar med en tjocklek på 80–150 μm och en porstorlek på 0,45 μm bör användas för att så cellerna. I valideringsstudien användes insatser av typen Millicell-HA 12 mm. Insatsens och membrantypens egenskaper är viktiga eftersom de kan påverka celltillväxten och den kemiska bindningen. Vissa typer av kemikalier kan binda sig till insatsmembranet Millicell-HA, vilket kan påverka tolkningen av resultaten. Kvalifikationskemikalier (se tillägg 3) bör användas för att påvisa motsvarighet om andra membran används.

▼M7

Kemisk bindning till insatsmembranet är vanligare för katjoniska kemikalier, t.ex. bensalkoniumklorid, som dras till det laddade membranet (7). Den kemiska bindningen till insatsmembranet kan öka kemikaliens exponeringsperiod, vilket leder till en överskattning av dess toxiska potential, men kan även fysiskt minska fluoresceinläckaget genom insatsen eftersom färgen binds till den katjoniska kemiska bindningen till insatsmembranet, vilket leder till en underskattning av kemikaliens toxiska potential. Detta kan enkelt övervakas genom att man endast exponerar membranet för den testade kemikaliens toppkoncentration och sedan tillsätter natriumfluoresceinfärg vid normal koncentration under standardtiden (ingen cellkontroll). Om natriumfluoresceinfärgen binds är insatsmembranet gult efter det att testmaterialet har tvättats av. Det är därför viktigt att känna till testkemikaliens bindande egenskaper för att kunna tolka kemikaliens effekter på cellerna.

Cellsådden på insatserna bör skapa ett konfluent monolager vid tidpunkten för den kemiska exponeringen: $1{,}6 \times 10^5$ celler bör tillsättas per insats (400 µl av en cellsuspension med en densitet på 4×10^5 celler/ml). Under dessa förhållanden erhålls ett konfluent monolager vanligen efter 96 timmars odling. Insatserna bör undersökas visuellt före sådd för att säkerställa att eventuella skador som registrerats vid den visuella kontroll som beskrivs i punkt 30 beror på hanteringen.

MDCK-cellodlingarna bör förvaras i inkubatorer i en fuktig atmosfär, vid 5 % ± 1 % CO_2 och 37 ± 1 °C. Cellerna får inte vara förorenade med bakterier, virus, mykoplasma eller svamp.

Applicering av test- och kontrollkemikalier

En ny stamlösning av testkemikalien bör beredas för varje försök och användas inom 30 minuter från beredningen. Testkemikalierna bör beredas i en kalciumhaltig HBSS (vid en koncentration på 1,0–1,8 mM) utan fenolrött för att undvika bindning av serumproteiner. Testkemikaliens löslighet vid 250 mg/ml i HBSS bör bedömas före testning. Om kemikalien bildar en stabil suspension eller emulsion vid denna koncentration (dvs. att kemikalien förblir enhetlig och varken stabiliseras eller separeras i fler än en fas) under 30 minuter kan HBBS fortfarande användas som lösningsmedel. Om kemikalien är olöslig i HBSS vid denna koncentration bör dock andra testmetoder än FL övervägas. Användning av lätt mineralolja som lösningsmedel om kemikalien är olöslig i HBSS bör övervägas med försiktighet eftersom det inte finns tillräckliga uppgifter tillgängliga för att dra en slutsats om hur FL-testet fungerar under sådana betingelser.

Alla kemikalier som ska testas bereds i steril kalciumhaltig HBBS (vid en koncentration på 1,0–1,8 mM), utan fenolrött, från stamlösningen, vid fem fasta koncentrationer som späds ut på grundval av vikt per volym: 1, 25, 100, 250 mg/ml och en outspädd eller mättad lösning. Vid testning av fasta kemikalier bör dessutom en mycket hög koncentration på 750 mg/ml användas. Denna koncentration av kemikalien kan behöva appliceras på cellerna med hjälp av en positiv deplacementpipett. Om toxiciteten visar sig vara mellan 25 och 100 mg/ml bör följande kompletterande koncentrationer testas två gånger: 1, 25, 50, 75, 100 mg/ml. FL_{20}-värdet bör härledas från dessa koncentrationer under förutsättning att acceptanskriterierna har uppfyllts.

Testkemikalierna appliceras på de konfluenta cellmonolagren när cellodlingsmediet har avlägsnats och cellmonolagren har tvättats två gånger med steril, varm (37 °C) kalciumhaltig HBBS (vid en koncentration på 1,0–1,8 mM) utan fenolrött. Före detta har filtren kontrollerats visuellt för att se om det finns tidigare skador som felaktigt kan tillskrivas eventuell inkompatibilitet med testkemikalierna. Minst tre replikat ska användas för varje koncentration av testkemikalien och för kontrollerna i varje omgång. Efter en minuts exponering i

▼M7

rumstemperatur avlägsnas testkemikalien försiktigt genom aspiration, monolagret tvättas två gånger med steril, varm (37 °C) kalciumhaltig HBBS (vid en koncentration på 1,0–1,8 mM) utan fenolrött, och fluoresceinläckaget mäts omedelbart.

Parallella negativa (NC) och positiva kontroller (PC) bör användas i varje körning för att visa att monolagrets integritet (NC) och cellernas sensitivitet (PC) håller sig inom ett fastställt historiskt acceptansintervall. Den föreslagna kemikalien för positiva kontroller är Brij 35 (CAS-nr 9002-92-0) vid 100 mg/ml. Denna koncentration bör ge omkring 30 % fluoresceinläckage (det godtagbara intervallet är 20–40 % fluoresceinläckage, dvs. skador på cellagret). Den föreslagna kemikalien för negativa kontroller är kalciumhaltig HBBS (vid en koncentration på 1,0–1,8 mM) utan fenolrött (obehandlad, blankkontroll). En maximal läckagekontroll bör också ingå i varje körning för att möjliggöra beräkning av FL_{20}-värdena. Maximalt läckage fastställs genom användning av en kontrollinsats utan celler.

Bestämning av fluoresceinets permeabilitet

Omedelbart efter avlägsnandet av test- och kontrollkemikalierna tillsätts 400µl av 0,1 mg/ml natriumfluoresceinlösning (0,01 % (w/v) kalciumhaltig HBBS [vid en koncentration på 1,0–1,8 mM] utan fenolrött) till insatserna (t.ex. Millicell-HA). Dessa odlingar förvaras i 30 minuter vid rumstemperatur. I slutet av inkubationsperioden med fluorescein avlägsnas insatserna försiktigt från varje hål. En visuell kontroll görs av varje filter och eventuella skador som kan ha uppstått under hanteringen registreras.

Den mängd fluorescein som har läckt genom monolagret och insatsen kvantifieras i den lösning som fanns kvar i hålen efter avlägsnandet av insatserna. Mätningarna görs i en spektrofluorometer vid excitations- och sändningsvåglängder på 485 nm respektive 530 nm. Spektrofluorometerns känslighet bör ställas in för högsta numeriska skillnad mellan maximal FL (insats utan celler) och minimal FL (insats med konfluent monolager behandlat med negativ kontroll). På grund av skillnaderna hos den använda spektrofluorometern bör man tillämpa en känslighetsgrad som ger en fluorescensintensitet > 4 000 vid den högsta fluoresceinläckagekontrollen. Det maximala FL-värdet bör inte vara större än 9 999. Maximal fluorescensintensitet för läckage bör hålla sig inom det linjära intervallet för den använda spektrofluorometern.

Tolkning av resultaten och förutsägbarhetsmodell

Mängden FL är proportionerlig till den kemiskt inducerade skadan på de täta fogarna. Procentandelen FL för varje testad koncentration av kemikalier beräknas från de FL-värden som erhållits för testkemikalien med hänvisning till FL-värdena från den negativa kontrollen (avläsning från det konfluenta cellmonolager som behandlats med negativ kontroll) och den maximala läckagekontrollen (avläsning av mängden FL genom en insats utan celler).

Medelvärde för maximal läckagefluorescensintensitet = x

Medelvärde för 0 % läckagefluorescensintensitet (NC) = y

Medelvärdet för 100 % läckage erhålls genom att medelvärdet för 0 % läckage subtraheras från medelvärdet för maximalt läckage.

dvs. x – y = z

Procentandelen läckage för varje fast dos erhålls genom att 0 % läckage subtraheras från medelvärdet för fluorescensintensitet i de tre replikatavläsningarna (m). Detta värde divideras sedan med 100 % läckage, dvs. % FL = [(m-y) / z] × 100 %, där

▼M7

m = medelvärde för fluorescensintensitet i de tre replikatmätningarna för den berörda koncentrationen

% FL = procentandel fluorescein som läcker igenom cellagret

Följande ekvation bör tillämpas för beräkningen av den kemiska koncentration som orsakar 20 % FL:

$$FL_D = [(A-B) / (C-B)] \times (M_C - M_B) + M_B$$

där

D = % hämning

A = % skada (20 % fluoresceinläckage)

B = % fluoresceinläckage < A

C = % fluoresceinläckage > A

M_C = koncentration (mg/ml) av C

M_B = koncentration (mg/ml) of B

Gränsvärdet för FL_{20} för förutsägelser om huruvida kemikalier är frätande/kraftigt irriterande för ögonen anges nedan:

FL_{20} (mg/ml)	FN GHS K&M	EU CLP K&M	U.S. EPA C&L
≤ 100	Kategori 1	Kategori 1	Kategori I

K&M: klassificering och märkning

FL-testmetoden rekommenderas endast för identifiering av vattenlösliga kemikalier som är frätande och kraftigt irriterande för ögonen (GHS-kategori 1, CLP-kategori 1, EPA-kategori I) (se punkterna 1 och 10).

För att identifiera vattenlösliga kemikalier (ämnen och blandningar) (3) (6) (7) som kemikalier som ”inducerar allvarlig ögonskada” (GHS-/CLP-kategori 1) eller som frätande eller kraftigt irriterande för ögonen EPA-kategori I) ska testkemikalien inducera ett FL_{20}-värde på ≤ 100 mg/ml.

Godkännande av resultat

Medelvärdet för maximalt fluoresceinläckage (x) ska vara högre än 4 000 (se punkt 31), medelvärdet för 0 % läckage (y) ska vara lika med eller lägre än 300, och medelvärdet för 100 % läckage (z) ska hålla sig mellan 3 700 och 6 000.

Testet anses godtagbart om den positiva kontrollen producerade 20–40 % skada på cellagret (mätt som % fluoresceinläckage).

DATA OCH RAPPORTERING

Data

För varje omgång ska data från enskilda replikathål (t.ex. värden för fluorescensintensitivet och beräknade FL-procentandelar för varje testkemikalie, inklusive klassificering) rapporteras i tabellform. Dessutom ska medelvärden ± SD för individuella replikatmätningar i varje körning redovisas.

▼M7

Testrapport

Testrapporten ska innehålla följande information:

Test- och kontrollkemikalier.

— Kemisk beteckning såsom den strukturella beteckning som används i Chemical Abstracts Service (CAS) och eventuella andra kända beteckningar

— Kemikaliens CAS-nummer, om det är känt.

— Ämnets eller blandningens renhet och sammansättning (viktprocent) i den mån uppgifterna finns att tillgå.

— Fysikaliska/kemiska egenskaper som är relevanta för utförandet av undersökningen (t.ex. fysiskt tillstånd, flyktighet, pH-värde, stabilitet, vattenlöslighet och kemisk klass).

— Behandling av test-/kontrollkemikalier före testning, om detta är tillämpligt (t.ex. uppvärmning, finfördelning).

— Lagringsförhållanden.

Motivering för den testmetod och det protokoll som använts

— Bör inbegripa överväganden när det gäller tillämpningsområde samt testmetodens begränsningar.

Testbetingelser

— Beskrivning av använt cellsystem, inklusive äkthetsintyg samt mykoplasmastatus för cellinjen.

— Detaljerade uppgifter om försöksförfarandet.

— Testkemikaliekoncentration(er).

— Exponeringstiden för testkemikalien.

— Inkubationstid med fluorescein.

— Beskrivning av eventuella modifieringar av försöksförfarandet.

— Beskrivning av utvärderingskriterierna.

— Hänvisningar till modellens historiska data (t.ex. negativa och positiva kontroller, referenskemikalier, i förekommande fall).

— Information om den tekniska kompetens som påvisats av laboratoriet.

Resultat

— Uppställning i tabellform av data från individuella testkemikalier och kontroller för varje körning och varje replikatmätning (inklusive individuella resultat, medelvärden och SD).

— Härledda klassificeringar med hänvisning till prediktionsmodell och/eller beslutskriterier.

— Beskrivning av övriga observerade effekter.

▼M7

Diskussion av resultaten.

— Bör inbegripa överväganden av tvetydiga resultat (punkt 35: FL_{20} > 100 mg/ml) och ytterligare tester.

Slutsatser

LITTERATUR

(1) UN (2009), United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Third revised edition, New York och Genève: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Finns 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. m.fl. (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 denna bilaga, *Akut ögonirritation/korrosion*.

(6) EC-ECVAM (1999), INVITOX Protocol 71: Fluorescein Leakage Test, Ispra, Italien: Europeiska centret för bestämning av alternativa metoder (Ecvam). Finns 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.

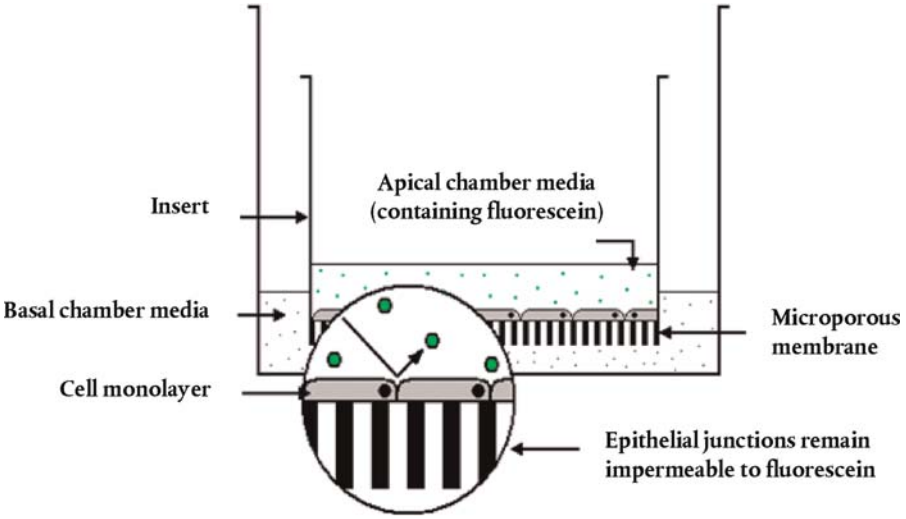
(8) OECD (2005), *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment*, OECD Series on Testing and Assessment No. 34. OECD, Paris.

▼M7

Tillägg 1

DIAGRAM ÖVER MDCK-CELLER OM ODLATS PÅ ETT INSATSMEMBRAN FÖR FL-TESTMETODEN

Ett konfluent lager av MDCK-celler odlas på semipermeabla membran i en insats. Insatserna placeras i hålen på 24-hålsplattor.



Figuren hämtad från: Wilkinson, P.J. (2006), Development of an *in vitro* model to investigate repeat ocular exposure, Ph.D. Thesis, University of Nottingham, Storbritannien.

▼M7

Tillägg 2

DEFINITIONER

Noggrannhet: Ett mått på hur väl testmetodresultaten och de godtagna referensvärdena överensstämmer med varandra. Den är ett mått på testmetodens prestanda och relevansaspekt. Detta begrepp används ofta omväxlande med ”konkordans” för att beskriva andelen korrekta resultat med en testmetod (38).

Kemikalie: ett ämne eller en blandning.

EPA-kategori I: Kemikalier som framkallar frätande (irreversibel skada på okulär vävnad) eller korneal påverkan eller irritation som varar mer än 21 dagar (2).

CLP-förordningen (förordning (EG) nr 1272/2008 om klassificering, märkning och förpackning av ämnen och blandningar): Genom denna förordning genomförs i Europeiska unionen (EU) FN:s GHS-system för klassificering av kemikalier (ämnen och blandningar).

Falskt negativt värde: den andel av alla positiva ämnen som av en testmetod felaktigt identifieras som negativ. Det är en indikator på testmetodens prestanda.

Falskt positivt värde: den andel av alla negativa (icke-aktiva) ämnen som av en testmetod felaktigt identifieras som positiva. Det är en indikator på testmetodens prestanda.

FL_{20}: kan uppskattas genom bestämning av den koncentration vid vilken den testade kemikalien orsakar 20 % fluoresceinläckage genom cellagret.

Fluoresceinläckage: den mängd fluorescein som passerar genom cellagret, mätt med spektrofluorometri.

GHS (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals) FN: s system för att klassificera ämnen och blandningar enligt standardiserade typer och nivåer av fysiska risker, hälsorisker och miljörisker och informera om resultaten genom t.ex. piktogram, signalord, faroangivelser, skyddsangivelser och säkerhetsdatablad i syfte att informera om ämnenas skadliga effekter för att skydda personer (inklusive arbetsgivare, arbetstagare, transportörer, konsumenter och personal inom räddningstjänsten) och miljön.

GHS-kategori 1: vävnadsskada i ögat eller kraftig synnedsättning som uppstår efter applicering av en testkemikalie på ögats främre yta och som inte är fullt reversibel inom 21 dagar från appliceringen (2).

Fara: inneboende egenskap hos ett ämne eller en situation som har potential att orsaka skadliga effekter när en organism, ett system eller en (del)population exponeras för ämnet.

Blandning används i FN: s GHS-klassificering; en blandning eller en lösning som består av två eller flera ämnen i vilka de inte reagerar.

Negativ kontroll: ett obehandlat replikat som innehåller alla komponenter i ett testsystem. Detta prov hanteras tillsammans med testkemikaliebehandlade prover och andra kontrollprover för att avgöra huruvida lösningsmedlet påverkar testsystemet.

▼M7

Icke-klassificerad: kemikalier som inte är klassificerade enligt GHS-kategori 1, 2A eller 2B, CLP-kategori 1 eller 2 eller EPA-kategorierna I, II eller III, ögonirriterande ämnen.

Ämne som är frätande för ögonen: a) kemikalier som orsakar irreversibel vävnadsskada på ögat, b) kemikalier som klassificeras som ögonirriterande enligt GHS-kategori 1, CLP-kategori 1 eller EPA-kategori I.

Ögonirriterande ämne: a) kemikalier som orsakar en reversibel ändring i ögat efter applicering på ögats främre yta, b) kemikalier som klassificeras som ögonirriterande enligt GHS-kategorierna 2A eller 2B, CLP-kategori 2 eller EPA-kategorierna II eller III.

Kraftigt ögonirriterande ämne: a) kemikalier som orsakar vävnadsskada i ögat efter applicering på ögats främre yta som inte läker inom 21 dagar från appliceringen eller orsakar allvarlig synnedsättning, b) kemikalier som klassificeras som ögonirriterande enligt GHS-kategori 1, CLP-kategori 1 eller EPA-kategori I.

Positiv kontroll: ett replikat som innehåller testsystemets alla komponenter och behandlas med en kemikalie som veterligen inducerar positiv respons. För att säkerställa att den positiva kontrollresponsens variationer kan bedömas över tiden, bör den positiva respons som framkallas inte vara för extrem.

Kvalifikationskemikalier: En deluppsättning av förteckningen över referenskemikalier som kan användas av ett nytt laboratorium för att visa att det är kvalificerat för att tillämpa den validerade referenstestmetoden.

Relevans: beskrivning av förhållandet mellan testet och den berörda effekten och huruvida detta förhållande är meningsfullt och användbart för ett visst ändamål. Relevansen är ett mått på hur väl man genom testet korrekt kan mäta och förutse den biologiska effekt det gäller. Relevans omfattar också överväganden om en testmetods noggrannhet (konkordans) (8).

Tillförlitlighet: mått på i vilken utsträckning en testmetod kan reproduceras inom och mellan laboratorier över tiden när den utförs med hjälp av samma protokoll. Tillförlitligheten bedöms genom att man beräknar reproducerbarheten inom och mellan laboratorier och repeterbarheten inom laboratorier.

Ersättningstest: ett test som är utformat att ersätta ett test som används rutinmässigt och som är godkänt för faroidentifiering och/eller riskbedömning och som har konstaterats ge motsvarande eller bättre skydd av människors eller djurs hälsa eller miljön, enligt det som är tillämpligt, jämfört med det godkända testet, för alla tänkbara testningssituationer och kemikalier.

Känslighet: den andel av alla positiva/aktiva kemikalier som klassificeras korrekt i testet. Det är ett mått på noggrannhet för en testmetod som ger kategoriska resultat och är en viktig faktor vid bedömningen av relevansen för en testmetod (8).

Allvarliga ögonskador: vävnadsskador som uppstår i ögat, eller allvarlig fysisk synnedsättning, efter applicering av en testkemikalie på ögats främre yta, och som inte är fullt reversibla inom 21 dagar från appliceringen.

Lösningsmedels-/vehikelkontroll: ett obehandlat prov som innehåller testsystemets alla komponenter, inbegripet lösningsmedlet eller vehikeln som behandlas tillsammans med testkemikaliebehandlade och andra kontrollprover i syfte att fastställa bakgrundsrespons för de prover som behandlas med testkemikalien

▼M7

upplöst i samma lösningsmedel eller vehikel. När detta prov testas med en parallell negativ kontroll, visar provet också huruvida lösningsmedlet eller vehikeln påverkar testsystemet.

Specificitet: den andel av alla negativa/inaktiva kemikalier som klassificeras korrekt i testet. Det är ett mått på noggrannhet för en testmetod som ger kategoriska resultat och är en viktig faktor vid bedömningen av relevansen för en testmetod.

Ämne: Används inom ramen för GHS för att beteckna kemiska grundämnen och deras föreningar i naturlig eller framställd form, inklusive eventuella tillsatser nödvändiga för att bevara produktens stabilitet och sådana föroreningar som härrör från framställningsprocessen, men exklusive eventuella lösningsmedel som kan avskiljas utan att det påverkar ämnets stabilitet eller ändrar dess sammansättning,

Testkemikalie: alla ämnen eller blandningar som testas med denna testmetod.

Stegvis testningsstrategi: en strategi för stegvis testning där all befintlig information om en testkemikalie granskas i en angiven ordning, med användning av förfarandet med sammanvägd bedömning (weight of evidence) för att avgöra om det finns tillräckligt med information till hands för att besluta om faroklassificering innan man går vidare till nästa steg. Om testkemikaliens förmåga att framkalla irritation kan fastställas på grundval av befintlig information behövs ingen ytterligare testning. Om testkemikaliens förmåga att framkalla irritation inte kan fastställas på grundval av befintlig information genomförs ett stegvis sekventiellt djurförsöksförfarande tills att det går att fastställa en otvetydig klassificering.

Validerad testmetod: en testmetod för vilken valideringsstudier har genomförts för att fastställa relevans (inbegripet noggrannhet) och tillförlitlighet för ett specifikt ändamål. Det är viktigt att notera att en validerad testmetod kanske inte är tillräckligt exakt och tillförlitlig när det gäller ett visst föreslaget ändamål (8).

Sammanvägd bedömning: (weight of evidence) ett förfarande där man bedömer styrkor och svagheter hos flera uppgifter för att nå fram till och motivera en slutsats rörande en kemikalies faropotential.

▼M7

Tillägg 3

KVALIFIKATIONSÄMNEN FÖR FL-TESTMETODEN

Före rutinanvändning av en testmetod bör laboratoriet påvisa den tekniska kvaliteten genom att korrekt identifiera klassificeringen av frätande verkan på ögonen för de åtta kemikalier som rekommenderas i tabell 1. Dessa kemikalier har valts ut att representera responsskalan för kemikalier som är lokalt frätande/irriterande för ögonen enligt resultaten från in vivo-test på kaninögon (TG 405, TM B.5(5)) (dvs. kategorierna 1, 2A, 2B eller Ingen klassificering enligt GHS). När det gäller FL-testets validerade användningsområde (dvs. endast att identifiera kemikalier som är frätande/kraftigt irriterande för ögonen) finns det dock bara två testutfall för klassificeringsändamål (frätande/kraftigt irriterande eller icke-frätande/ej kraftigt irriterande) som laboratoriet kan använda för att visa att det är kvalificerat. Till övriga kriterier hör att ämnena ska vara kommersiellt tillgängliga, att det finns tillgång till in vivo-referensdata av hög kvalitet och att det finns data av hög kvalitet från FL-testmetoden. Av detta skäl valdes kvalifikationskemikalierna från dokumentet *Fluorescein Leakage Assay Background Review Document as an Alternative Method for Eye Irritation Testing* (8), som användes för den retrospektiva valideringen av FL-testmetoden.

Tabell 1

Rekommenderade ämnen för att påvisa teknisk kvalitet med FL-testmetoden

Kemikalie	CAS-nummer	Kemisk klass (1)	Fysikalisk form	In vivo-klassificering (2)	In vitro-klassificering (3)
Bensalkoniumklorid (5 %)	8001-54-5	Oniumförening	Vätska	Kategori 1	Frätande/Kraftigt irriterande
Prometazinhydroklorid	58-33-3	Amin/amidin, heterocyklisk organisk sulfatförening	Fast ämne	Kategori 1	Frätande/Kraftigt irriterande
Natriumhydroxid (10 %)	1310-73-2	Alkali	Vätska	Kategori 1	Frätande/Kraftigt irriterande
Natriumlaurylsulfat (15 %)	151-21-3	Karboxylsyra (salt)	Vätska	Kategori 1	Frätande/Kraftigt irriterande
4-karboxybensaldehyd	619-66-9	Karboxylsyra, aldehyd	Fast ämne	Kategori 2 A	Icke-frätande/Icke kraftigt irriterande
Ammoniumnitrat	6484-52-2	Oorganiskt salt	Fast ämne	Kategori 2 A	Icke-frätande/Icke kraftigt irriterande
Etyl-2-metylacetoacetat	609-14-3	Keton, ester	Vätska	Kategori 2 B	Icke-frätande/Icke kraftigt irriterande
Glycerol	56-81-5	Alkohol	Vätska	Ingen klassificering	Icke-frätande/Icke kraftigt irriterande

Förkortningar: CAS-nr: nummer i registret för Chemical Abstracts Service.

(1) Varje testkemikalie tilldelades en kemisk klass med användning av ett standardsystem baserat på klassificeringssystemet National Library of Medicine Medical Subject Headings (MeSH) (finns på http//www.nlm.nih.gov/mesh).

(2) Baserat på resultat från in vivo-test på kaninögon (OECD TG 405, TM B.5) och med användning av GHS och CLP.

(3) Baserat på resultat som erhållits med FL (INVITTOX-protokoll nr 71 (6)).

▼M7

B.62 ALKALINE COMET ASSAY IN VIVO PÅ DÄGGDJUR

INLEDNING

Denna testmetod motsvarar OECD:s testriktlinje (TG) 489 (2016). Alkaline comet assay in vivo (gelelektrofores av enstaka celler) (nedan kallad *kometmetoden*) används för att detektera brott på DNA-strängar i celler eller kärnor som isolerats från flera vävnader från djur, vanligen gnagare, som har exponerats för potentiellt gentoxiska material. Kometmetoden har granskats och rekommendationer har publicerats av flera expertgrupper (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10). Denna testmetod är en del av en serie av testmetoder för genetisk toxikologi. Ett OECD-dokument som ger kortfattad information om tester inom genetisk toxikologi och en översikt över de senaste ändringarna av dessa testriktlinjer har utarbetats (11).

Syftet med kometmetoden är att identifiera kemikalier som orsakar DNA-skador. Under alkaliska betingelser (> pH 13 kan kometmetoden detektera enkla och dubbla strängbrott, t.ex. till följd av samverkan med DNA, alkali-labila ställen eller obeständiga brott på DNA-strängar till följd av DNA-excisionsreparering. Dessa strängar kan repareras och kan leda till en ej beständig effekt, kan vara dödliga för cellen eller kan fixeras i en mutation som leder till en permanent viabel ändring. De kan också leda till kromosomskador, som även förknippas med många sjukdomar hos människan, inklusive cancer.

Ett formellt valideringsförsök av kometmetoden genomfördes 2006–2012, samordnat av det japanska centret för validering av alternativa metoder (JaCVAM) tillsammans med Europeiska centret för bestämning av alternativa metoder (ECVAM) och amerikanska ICCVAM (*Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods*) samt NICEATM (*TP Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods*) (12). Denna testmetod inbegriper rekommenderad användning av och begränsningar hos kometmetoden och baseras på det slutliga protokoll (12) som användes i valideringsförsöket samt på ytterligare relevanta publicerade och opublicerade data (skyddade laboratoriedata).

Definitioner av centrala begrepp anges i tillägg 1. Det bör noteras att många analysplattformar kan användas för detta försök (objektglas, gelklickar, 96-hålsplattor osv.). För enkelhetens skull används termen ”analysplattform” i resten av detta dokument.

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN OCH BEGRÄNSNINGAR

Kometmetoden är en metod för mätning av brott på DNA-strängar i eukaryota celler. Enskilda celler/kärnor inbäddade i agaros på en analysplattform lyseras med detergent och hög saltkoncentration. Detta lyseringssteg bryter ned cell- och kärnmembranen och möjliggör frisläppande av tvinnade DNA-slingor, som vanligen kallas nukleoider, och DNA-fragment. Elektrofores vid högt pH ger upphov till strukturer som liknar kometer, och dessa kan efter tillsats av lämpliga fluorescerande färgämnen observeras med hjälp av fluorescensmikroskopi. DNA-fragmenten migrerar bort från ”komethuvudet” till ”kometsvansen” baserat på storlek och kometsvansens intensitet i förhållande till den totala intensiteten (huvud plus svans) avspeglar graden av DNA-brott (13) (14) (15).

Kometmetoden är särskilt relevant för att bedöma gentoxiska risker, eftersom försöksresponsen är beroende av in vivo ADME (absorption, distribution, metabolism och exkretion) och även av DNA-reparationsprocesserna. Dessa kan variera mellan arter, vävnader och typer av DNA-skador.

▼M7

För att uppfylla djurskyddskraven, särskilt minskad användning av försöksdjur (3R-principen – ersättning, begränsning och förfining), kan detta försök även integreras med andra toxikologiska studier, t.ex. upprepade dostoxicitetsundersökningar (10) (16) (17). Ett annat alternativ är att kombinera endpointen med andra endpoints för gentoxicitet, t.ex. mikrokärntestet av erytrocyter hos däggdjur (18) (19) (20). Kometmetoden utförs oftast på gnagare, även om det har tillämpats på andra däggdjurs- och icke-däggdjursarter. Användning av andra arter än gnagare bör motiveras etiskt och vetenskapligt från fall till fall och det rekommenderas starkt att kometmetoden endast utförs på andra arter än gnagare som en del av en annan toxicitetsstudie, inte som ett fristående test.

Valet av exponeringsväg och de vävnader som ska undersökas bör grundas på all tillgänglig/befintlig kunskap om testkemikalierna, t.ex. avsedd/förväntad exponeringsväg för människor, metabolism och distribution, potential för kontaktpunktseffekter, strukturella varningssignaler, andra data om gentoxicitet eller toxicitet samt undersökningens syfte. I förekommande fall kan därför testkemikaliernas gentoxiska potential undersökas i målvävnader för cancerogena och/eller andra toxiska effekter. Försöket anses även vara användbart för fortsatta undersökningar av gentoxicitet, med detektion i ett in vitro-system. Det är lämpligt att använda kometmetoden på en vävnad av intresse när det rimligen kan förväntas att vävnaden kommer att exponeras på lämpligt sätt.

De mest omfattande valideringarna av försöket har gjorts av somatiska vävnader hos hanråttor i samarbetsstudier såsom JaCVAM-testet (12) och i Rothfuss m.fl., 2010 (10). I JaCVAM:s internationella valideringsförsök används lever och magsäck. Levern är lämplig eftersom den är det mest aktiva organet i kemikaliers metabolism och ofta ett målorgan för cancerogenitet. Magsäcken är lämplig eftersom den vanligen är det första organ som kemikalier kommer i kontakt med efter oral exponering, även om andra delar av matsmältningsorganet såsom tolvfingertarmen och tomtarmen bör övervägas som kontaktpunktsvävnader. De kan dessutom vara mer relevanta för människor än gnagares glandulära magsäck. Det är viktigt att se till att sådana vävnader inte exponeras för alltför höga koncentrationer av testkemikalien (21). Tekniken är i princip tillämplig på alla vävnader från vilka analyserbara enstaka cell-/kärnsuspensioner kan härledas. Skyddade data från flera laboratorier visar att tekniken har tillämpats med framgång på många olika vävnader. Det finns även många publikationer som visar att den är tillämplig på andra organ eller vävnader än lever och magsäck, t.ex. tomtarm (22), njure (23) (24), hud (25) (26) eller urinblåsa (27) (28), lunga och celler från bronkoalveolärt lavage (BAL) (relevant för undersökningar av kemikalier som inandas) (29) (30). Tester har också utförts på flera organ (31) (32).

Gentoxiska effekter på könsceller kan vara av intresse, men det bör noteras att standardvarianten av kometmetoden såsom den beskrivs i denna testmetod inte anses lämplig för att mäta brott på DNA-strängar i mogna könsceller. Eftersom höga och variabla bakgrundsnivåer hos DNA-skador har rapporterats i litteraturgranskningar om användningen av kometmetoden för gentoxicitet hos könsceller (33), krävs protokolländringar och förbättrade standardiserings- och valideringsstudier innan kometmetoden för mogna könsceller (t.ex. spermier) kan inbegripas i denna testmetod. Det rekommenderade exponeringssystem som beskrivs i denna testmetod är inte optimalt, och det krävs längre exponerings- eller provtagningstider för en meningsfull analys av brott på DNA-strängar hos mogna spermier. Gentoxiska effekter som uppmätts med kometmetoden i testikelceller på olika differentieringsstadier har beskrivits i litteraturen (34) (35). Det bör dock noteras att könskörtlar innehåller en blandning av somatiska celler och könsceller. Därför avspeglar positiva resultat i hela könskörtlar (testis) inte nödvändigtvis skada på könsceller. De visar dock att de testade kemikalierna och/eller dess metaboliter har nått könskörteln.

▼M7

Tvärbindningar kan inte detekteras på ett tillförlitligt sätt med standardförsöksbetingelserna för kometmetoden. Under vissa modifierade försöksbetingelser är det möjligt att detektera DNA-DNA- och DNA-protein-tvärbindningar och andra basmodifikationer, såsom oxiderade baser (23) (36) (37) (38) (39). Det krävs dock ytterligare arbete för att karakterisera dessa nödvändiga protokollmodifieringar på lämpligt sätt. Detektering av tvärbindande agens är således inte det främsta syftet med försöket såsom det beskrivs här. Försöket är inte lämpligt för detektion av aneugener, inte ens med modifieringar.

På grund av nuvarande kunskapsstatus har kometmetoden flera andra begränsningar (se tillägg 3). Testmetoden förväntas granskas i framtiden och om nödvändigt revideras mot bakgrund av den erfarenhet som vunnits.

Innan testmetoden används på en blandning i syfte att samla in data för ett lagstadgat ändamål bör man överväga om, och i så fall varför, den kommer att ge godtagbara resultat för det syftet. Sådana överväganden är inte nödvändiga om blandningen måste provas enligt lag.

TESTMETODENS PRINCIP

Försöksdjuren exponeras för testkemikalien på ett lämpligt sätt. En detaljerad beskrivning av dosering och provtagning ges i punkterna 36–40. Vävnaderna av intresse dissekeras vid de valda provtagningstidpunkterna och suspensioner av enstaka celler/kärnor bereds (perfusion in situ kan utföras om det anses användbart, t.ex. för lever) och bäddas in i mjukt agar så att de immobiliseras på analysplattformar. Cellerna/kärnorna behandlas med lyseringsbuffert för att avlägsna cell- och/eller kärnmembran och exponeras för stark alkali, t.ex. pH $\geq$ 13, så att DNA:t löser upp sig och lossade DNA-slingor och fragment frigörs. Kärn-DNA i agar genomgår därefter elektrofores. Normala icke-fragmenterade DNA-molekyler förblir i den position där kärn-DNA fanns i agar, medan eventuellt fragmenterat DNA och lossade DNA-slingor migrerar mot anoden. Efter elektrofores visualiseras DNA genom lämplig fluorescerande färg. Beredningarna bör analyseras med mikroskop och hel- eller halvautomatiska bildanalyssystem. Den mängd DNA som har migrerat under elektrofores och migrationsavståndet avspeglar DNA-fragmentens mängd och storlek. Det finns flera endpoints för kometmetoden. DNA-innehållet i kometsvansen (% DNA i kometsvans eller % intensitet i kometsvans) har rekommenderats för bedömningen av DNA-skador (12) (40) (41) (42). Efter analys av ett tillräckligt antal kärnor analyseras data med lämpliga metoder för att bedöma försöksresultaten.

Det bör noteras att ändringar av olika aspekter av metoden, bland annat provberedning, elektroforesbetingelser, visuella analysparametrar (t.ex. färgintensitet, mikroskopljusets intensitet och användning av mikroskopfilter samt kameradynamik) och omgivningsförhållanden (t.ex. bakgrundsbelysning) har undersökts och kan påverka DNA-migrationen (43) (44) (45) (46).

KVALIFIKATIONSPRÖVNING AV LABORATORIET

Laboratorierna bör fastställa att de är kvalificerade för att utföra kometmetoden genom att visa sin förmåga att erhålla suspensioner med enstaka celler eller kärnor av tillräcklig kvalitet för varje målvävnad och varje använd art. Beredningarnas kvalitet utvärderas först av procentandelen DNA i kometsvans för vehikelbehandlade djur som håller sig inom ett reproducerbart lågt intervall. Aktuella data tyder på att gruppens medelvärde för procentandelen DNA i kometsvans (*group mean % tail DNA* – baserat på genomsnittet av medianvärdena, se punkt 57 för närmare uppgifter om dessa termer) hos råttlever bör helst inte

▼M7

överstiga 6 %, vilket överensstämmer med värdena i JaCVAM:s valideringsförsök (12) och i andra publicerade och skyddade data. För närvarande finns inte tillräckliga data för rekommendationer om optimala eller godtagbara intervall för andra vävnader. Detta utesluter inte användningen av andra vävnader om det är motiverat. Testrapporten bör innehålla en lämplig granskning av resultaten av kometmetoden för dessa vävnader jämfört med publicerad litteratur eller skyddade data. För det första är en låg procentandel DNA i kometsvans önskvärd i syfte att skapa ett tillräckligt dynamiskt intervall för att det ska vara möjligt att detektera en positiv effekt. För det andra ska varje laboratorium kunna reproducera förväntad respons för direkta mutagener och promutagener med olika verkningsmekanismer enligt tabell 1 (punkt 29).

Positiva ämnen kan väljas om så är lämpligt, t.ex. från JaCVAM:s valideringsförsök (12) eller från andra publicerade data (se punkt 9). Valen ska motiveras och en tydligt positiv respons i vävnaden ska visas. Förmåga att detektera svaga effekter av kända mutagener som EMS vid låga doser ska också visas, t.ex. genom att fastställa dos-responsförhållanden med lämpliga antal doser i lämpliga intervaller. Laboratorierna bör främst inrikta sig på att visa att de är kvalificerade för de oftast använda vävnaderna, t.ex. lever från gnagare, där det är möjligt att jämföra befintliga data och förväntade resultat (12). Data för andra vävnader, t.ex. magsäck/tolvfingertarm/tomtarm, blod osv. kan samlas in samtidigt. Laboratoriet måste visa att det är kvalificerat för varje individuell vävnad hos varje art som det planerar att undersöka. Det måste också visa att en godtagbar positiv respons med en känd mutagen (t.ex. EMS) kan erhållas för den vävnaden.

Data om vehikel-/negativ kontroll bör samlas in för att påvisa att data om negativ respons kan reproduceras och för att säkerställa att försökets tekniska aspekter har kontrollerats på lämpligt sätt eller påvisa behovet av en omvärdering av de historiska kontrollintervallen (se punkt 22).

Laboratoriet kan samla in olika vävnader vid obduktion och behandla dem för komet-analys, men det måste vara kvalificerat för att skörda flera vävnader från ett enda djur för att säkerställa att eventuella DNA-skador inte förloras och att komet-analysen inte äventyras. Tidsperioden från avlivning till avlägsnande av vävnader för behandling kan vara kritisk (se punkt 44).

Djurskyddsaspekter måste beaktas vid kvalifikation för detta test, och därför kan vävnader från djur som använts i andra test även användas vid kompetensutvecklingen för testets olika aspekter. Dessutom är det kanske inte nödvändigt att utföra en fullständig undersökning när en ny testmetod etableras i laboratoriet, och färre djur eller testkoncentrationer kan användas vid utvecklingen av den nödvändiga kompetensen.

Historiska kontrolldata

Under kvalifikationsundersökningarna bör laboratoriet bygga upp en historisk databas för att fastställa positiva och negativa kontrollintervall och fördelningar för relevanta vävnader och arter. Rekommendationer om hur man bygger upp och använder historiska kontrolldatabaser (t.ex. kriterier för att innefatta och utesluta data samt acceptanskriterier för ett givet försök) finns i litteraturen (47). Olika vävnader och arter och olika vehiklar och administrationsvägar kan ge olika negativa kontrollvärden för procentandelen DNA i kometsvans. Det är därför

▼M7

viktigt att fastställa negativa kontrollintervall för varje vävnad och art. Laboratorierna bör använda kvalitetskontrollmetoder såsom kontrolldiagram (t.ex. C-diagram eller X-stapeldiagram (48)), för att fastställa hur variabla deras data är och för att visa att metoden är ”under kontroll”. Valet av lämpliga positiva kontrollämnen, dosintervall och försöksbetingelser (t.ex elektroforesbetingelser) kan även behöva optimeras för att detektera svaga effekter (se punkt 17).

Eventuella ändringar av försöksprotokollen bör övervägas när det gäller deras överensstämmelse med laboratoriets befintliga historiska kontrolldatabaser. Alla större inkonsekvenser bör leda till att en ny historisk kontrolldatabas upprättas.

BESKRIVNING AV TESTMETODEN

Förberedelser

Val av djurart

I regel används vanliga laboratoriestammar av friska unga vuxna gnagare (6–10 veckor gamla vid behandlingsstarten, även om något äldre djur också är godtagbara). Valet av gnagarart bör baseras på i) arter som använts i andra toxicitetsundersökningar (för att möjliggöra korrelering av data och integrerade undersökningar), ii) arter som har utvecklat tumörer i en cancerogenitetsstudie (vid undersökningar av carcinogenesmekanismer), eller iii) arter med metabolism som är mest relevanta för människor, om det är känt. Råttor används rutinmässigt i detta test. Andra arter kan dock användas om det är etiskt och vetenskapligt motiverat.

Inhysnings- och utfodringsförhållanden

För gnagare är den ideala temperaturen i försöksdjurens rum är 22 °C (± 3 °C). Den relativa fuktigheten bör helst vara 50–60 %, men minst 30 % och bör helst inte överstiga 70 % utom när rummet rengörs. Artificiell belysning bör användas, med en dygnsrytm på 12 timmar ljus och 12 timmar mörker. För utfodring kan konventionellt laboratoriefoder användas med obegränsad tillgång till dricksvatten. Valet av foder kan påverkas av behovet av att säkerställa en lämplig blandning av en testkemikalie när den administreras genom denna väg. Gnagarna bör hållas i små grupper (vanligen högst fem) av samma kön, om inget aggressivt beteende kan förväntas. Djuren får endast hållas individuellt om det är vetenskapligt motiverat. Fasta golv bör användas när det är möjligt eftersom nätgolv kan orsaka allvarlig skada (49). Lämplig miljöberikning krävs.

Förberedelse av djuren

Djuren fördelas slumpvis i kontroll- och behandlingsgrupper. Djuren identifieras individuellt och acklimatiseras till laboratoriemiljö under minst fem dagar före behandlingsstart. Den minst invasiva metoden för unik identifiering av djur måste användas. Lämpliga metoder är ringmärkning, taggar, mikrochip och biometrisk identifiering. Tå- och öronklippning är inte vetenskapligt motiverat i dessa tester. Burarna bör ordnas så att eventuella effekter på grund av deras placering minimeras. När undersökningen ska påbörjas är det lämpligt att viktskillnaden mellan djuren är så liten som möjligt och den bör inte överstiga ± 20 %.

Beredning av doser

Fasta testkemikalier bör lösas upp i, eller blandas med, lämpliga vehiklar eller blandas i foder eller dricksvatten innan dosen administreras till djuren. Testkemikalier i flytande form kan doseras direkt eller spädas ut före doseringen. Vid inhalationexponering kan testkemikalier administreras såsom gas, ånga eller en fast/flytande aerosol, beroende på deras fysikalisk-kemiska egenskaper (50) (51).

Nygjorda beredningar av testkemikalien bör användas om inte stabilitetsdata visar att lagringen är acceptabel och lämpliga lagringsförhållanden bör fastställas.

▼M7

Testbetingelser

Vehikel

Vehikeln bör inte ge upphov till toxiska effekter vid de dosnivåer som används och bör inte kunna misstänkas för att reagera kemiskt med testkemikalierna. Om andra vehiklar än väl kända används bör det finnas data som visar att de är kompatibla när det gäller testdjur, administreringssätt och endpoint. När det är möjligt, rekommenderas att man i första hand överväger vattenbaserade lösningsmedel/vehiklar. Det bör noteras att vissa vehiklar (särskilt viskösa vehiklar) kan inducera inflammation och öka bakgrundnivåerna för brott på DNA-strängar vid kontaktpunkten, särskilt vid flera administreringar.

Kontroller

Positiva kontroller

Vid denna tidpunkt inkluderas vanligen en grupp på minst tre analyserbara djur av samma kön eller i förekommande fall av båda könen (se punkt 32), som behandlas med ett positivt kontrollämne. I framtiden kan det bli möjligt att påvisa lämplig kvalifikation för att minska behovet av positiva kontroller. Om provtagningarna sker vid flera tillfällen (t.ex. med ett enda administreringsprotokoll) behöver man bara inkludera positiva kontroller vid ett av provtagningstillfällena, men det är viktigt att säkerställa en lämplig balans i försöket (se punkt 48). Det är inte nödvändigt att administrera parallella positiva kontrollämnen på samma sätt som testkemikalien, även om det är viktigt att samma administreringssätt används vid mätningen av kontaktpunktseffekter. Man ska visa att de positiva kontrollämnena inducerar brott på DNA-strängar i alla vävnader för testkemikalien i fråga. EMS är sannolikt den lämpligaste positiva kontrollen, eftersom den har producerat brott på DNA-strängar i alla undersökta vävnader. Doserna av positiva kontrollämnen ska väljas så att de producerar måttliga effekter som möjliggör en kritisk bedömning av försökets prestanda och sensitivitet. De kan baseras på dos-responskurvor som etablerats av laboratoriet när det kvalificerade sig för testet. Procentandelen DNA i kometsvans hos de parallella positiva kontrolldjuren bör överensstämma med laboratoriets på förhand fastställda intervall för varje enskild vävnad och provtagningstid för arten (se punkt 16). Exempel på positiva kontrollämnen och vissa av deras målvävnader (gnagare) finns i tabell 1. Andra ämnen än de som anges i tabell 1 kan väljas om det är vetenskapligt motiverat.

Tabell 1

Exempel på positiva kontrollämnen och vissa av deras målvävnader

Ämnen och CAS-RN-nummer
Etylmetansulfonat (CAS RN 62-50-0) för alla vävnader
Etylnitrosourea (CAS RN 759-73-9) för lever och magsäck, tolvfingertarm eller tomtarm
Metylmetansulfonat (CAS RN 66-27-3) för lever och magsäck, tolvfingertarm eller tomtarm, lunga och celler från bronkoalveolärt lavage (BAL), njure, urinblåsa, lunga, testis och benmärg/blod
N-metyl-N′-nitro-N-nitrosoguanidin (CAS RN: 70-25-7) för magsäck, tolvfingertarm eller tomtarm
1,2-dimetylhydrazin 2HCl (CAS RN 306-37-6) för lever och inälvor
N-metyl-N-nitrosourea (CAS RN 684-93-5) för lever, benmärg, blod, njure, magsäck, tomtarm och hjärna.

▼M7

Negativa kontroller

En grupp av negativa kontrolldjur, behandlade med endast vehikel, och i övrigt behandlade på samma sätt som behandlingsgrupperna, bör inkluderas för varje test för varje provtagningstillfälle och vävnad. Procentandelen DNA i kometsvans hos de parallella negativa kontrolldjuren bör hålla sig inom laboratoriets på förhand fastställda bakgrundsintervall för varje enskild vävnad och provtagningstid för arten (se punkt 16). I avsaknad av historiska eller publicerade kontrolldata som visar att inga skadliga eller gentoxiska effekter induceras av den valda vehikeln, antalet administreringar eller administreringsvägar, bör preliminära undersökningar göras innan den fullständiga undersökningen genomförs, i syfte att fastställa att vehikelkontrollen är godtagbar.

FÖRFARANDE

Djurens antal och kön

Det finns få data om hondjur som möjliggör en jämförelse mellan könen i samband med kometmetoden. Dock är andra gentoxiska responser in vivo vanligen liknande mellan han- och hondjur, och därför kan de flesta undersökningar utföras på båda könen. Om det finns data som visar på relevanta skillnader mellan hanar och honor (t.ex. skillnader i systemisk toxicitet, metabolism, biotillgänglighet osv., inklusive ett preliminärt test) bör båda könen användas. I detta fall kan det vara lämpligt att göra en undersökning av båda könen, t.ex. som en del av en upprepad dostoxicitetsundersökning. Om båda könen används kan ett faktorförsök vara lämpligt. En närmare beskrivning av hur man analyserar data med användning av faktorförsök ges i tillägg 2.

Gruppernas storlek vid försöksstarten (och under kvalificeringen) bör fastställas. Målet bör vara minst fem analyserbara djur av ett kön, eller av varje kön om båda könen används, per grupp (färre i den parallella positiva kontrollgruppen, se punkt 29). I de fall där exponering av människa för kemikalier kan ge könsspecifika resultat, som t.ex. för vissa läkemedel, bör testet utföras med försöksdjur av lämpligt kön. Som en vägledning för ett vanligt krav på maximalt antal djur skulle det krävas 25–35 djur för en undersökning som utförs enligt de parametrar som fastställs i punkt 33, med tre dosgrupper och parallella negativa och positiva kontrollgrupper (fem djur av ett kön i varje grupp).

BEHANDLINGSSCHEMA

Djuren bör ges dagliga behandlingar under två eller flera dagar (dvs. två eller flera behandlingar i intervall på cirka 24 timmar) och proverna bör samlas in varannan till var sjätte timme (eller vid T_{max}) efter den sista behandlingen (12). Prover från förlängda doseringssystem (t.ex. 28 dagars daglig dosering) är godtagbara. Det har visats att kometmetoden och mikrokärntest av erytrocyter kan kombineras med framgång (10) (19). Man bör dock noggrant överväga logistiken i samband med provtagning av vävnader för komet-analysen förutom de krav som gäller för provtagning av vävnader för andra typer av toxikologiska bedömningar. Skörd 24 timmar efter den sista dosen, vilket är typiskt för en allmän toxicitetsundersökning, är t.ex. olämpligt i de flesta fall (se punkt 40 om provtagningstidpunkter). Användning av andra behandlings- och provtagningsscheman bör motiveras (se tillägg 3). En enda behandling med flera provtagningstillfällen kan tillämpas, men det bör noteras att fler djur kommer att krävas för undersökningar med en enda administrering eftersom provtagningstillfällena är fler. I vissa fall kan detta dock vara att föredra, t.ex. när testkemikalien inducerar överdriven toxicitet efter upprepade administreringar.

▼M7

Hur testet än genomförs är det godtagbart så länge testkemikalien ger ett positivt svar, eller för en negativ undersökning, så länge direkta eller indirekta bevis till stöd för exponering eller toxicitet för målvävnaderna har visats eller om gränsdosen uppnås (se punkt 36).

Testkemikalier kan även administreras i form av en delad dos, dvs. två behandlingar under en och samma dag med högst två till tre timmars intervall, för att på så sätt underlätta administrering av stora volymer med material. Under dessa omständigheter bör provtagningstillfällena schemaläggas baserat på tidpunkten för den sista doseringen (se punkt 40).

Dosnivåer

Om det inte finns lämpliga data från andra relevanta undersökningar som kan ge vägledning om dosval och en preliminär undersökning därför utförs för att fastställa omfattningen, bör denna undersökning utföras i samma laboratorium, och med samma arter, stammar, kön och behandlingsschema som senare ska användas i huvudundersökningen enligt gällande strategier för preliminära undersökningar. Syftet med undersökningen bör vara att identifiera högsta tolererbara dos (MTD), som definieras som den dos som inducerar små toxiska effekter i förhållande till undersökningsperiodens varaktighet (t.ex. tydliga kliniska tecken som onormalt beteende eller onormala reaktioner, mindre viktminskningar eller cytotoxicitet i målvävnaden, men inte dödlighet eller tecken på smärta, lidande eller ångest som kräver avlivning. För en icke-toxisk testkemikalie med en administreringsperiod på 14 dagar eller mer är den högsta dosen (gränsdosen) 1 000 mg/kg kroppsvikt/dag. För administrationsperioder på mindre än 14 dagar är den högsta dosen (gränsdosen) 2 000 mg/kg kroppsvikt/dag. Dessa gränser kan variera för vissa typer av testkemikalier (t.ex. humanläkemedel) som omfattas av särskilda krav.

Kemikalier som uppvisar mättnad av toxikokinetiska egenskaper eller inducerar avgiftningsprocesser som kan leda till minskad exponering efter långtidsadministrering kan vara undantag från kriterierna för dosbestämning och bör utvärderas från fall till fall.

För båda akuta och subakuta versioner av kometmetoden bör man, förutom högsta tolererbara dos (MTD, högsta möjliga dos, maximal exponering eller gränsdos) välja en sjunkande sekvens med minst två lämpligt skilda dosnivåer (företrädesvis separerade med mindre än $\sqrt{10}$) för varje provtagningstidpunkt för att visa dosrelaterade responser. Dessa dosnivåer bör helst även täcka ett intervall från maximal toxicitet till svag eller ingen toxicitet. När toxicitet i målvävnaden observeras vid alla testade dosnivåer rekommenderas fortsatta undersökningar med icke-toxiska doser (se punkterna 54–55). Studier som syftar till att mer grundligt undersöka formen för dos-responskurvan kan kräva ytterligare dosgrupper.

Administrering av doser

Den förväntade exponeringsvägen för människor bör beaktas vid utformningen av en analys. Därför kan exponeringsvägar (t.ex. föda, dricksvatten, lokalt subkutant, intravenöst, oralt (via sond), inhalation, intratrakealt eller implantation) väljas som motiverad exponering. Exponeringsvägen bör i alla händelser väljas för att säkerställa lämplig exponering av målvävnaden. Intraperitoneal injektion rekommenderas generellt inte eftersom den inte är en avsedd exponeringsväg för människor, och bör endast användas med specifik vetenskaplig motivering (t.ex för vissa kontrollämnen, forskningsändamål eller för vissa läkemedel som ges intraperitonealt. Den maximala vätskevolymen som kan administreras genom sondmatning eller injektion vid ett tillfälle beror på försöksdjurets storlek. Volymen får inte överstiga 1 ml per 100 g kroppsvikt, utom för vattenlösningar där volymen kan uppgå till 2 ml per 100 g kroppsvikt. Användning av större volymer än så (om det är tillåtet enligt djurskyddslagstiftningen) ska motiveras. När

▼M7

så är möjligt bör olika dosnivåer uppnås genom en justering av koncentrationen av doseringsberedningen för att säkerställa en konstant volym i förhållande till kroppsvikt vid alla dosnivåer.

Provtagningstid

Provtagningstiden är en kritisk variabel eftersom den avgörs av den period som behövs för att testkemikalierna ska nå högsta koncentration i målvävnaden och inducera brott på DNA-strängar, men innan dessa brott avlägsnas, repareras eller leder till celldöd. Vissa av de skador som leder till brott på DNA-strängen och som detekteras med kometmetoden kan vara mycket kortvariga, åtminstone för vissa kemikalier testade in vitro (52) (53). Om sådana övergående DNA-skador misstänks bör åtgärder därför vidtas för att begränsa förlusten genom att säkerställa att vävnaderna provtas tillräckligt tidigt, eventuellt tidigare än de standardtidpunkter som anges nedan. De optimala provtagningstidpunkterna kan vara specifika för kemikalien eller administreringsvägen, t.ex. vid snabb vävnadsexponering med intravenös administrering eller exponering via inandning. Provtagningstillfällena bör följaktligen bestämmas med utgångspunkt i kinetiska data om sådana finns tillgängliga (t.ex. den tidpunkt (T_{max}) då högsta värde för plasma eller vävnadskoncentration (C_{max}) uppnås, eller vid stabilt tillstånd vid flera administreringar. Om kinetiska data inte finns tillgängliga är en lämplig kompromiss för mätningen av gentoxicitet att ta proverna 2–6 timmar efter den sista behandlingen för två eller flera behandlingar, eller både 2–6 timmar och 16–26 timmar efter en enda behandling. Det är dock viktigt att se till att alla djur obduceras samtidigt efter den sista (eller enda) dosen. Information om förekomsten av toxiska effekter hos målorganen (i förekommande fall) kan även användas för att välja lämpliga provtagningstillfällen.

Observationer

Allmänna kliniska observationer av djurens hälsa bör göras och registreras minst en gång per dag, helst vid samma tidpunkt med hänsyn till maximalt förväntade effekter efter doseringen (54). Minst två gånger dagligen bör djuren observeras beträffande morbiditet och mortalitet. För undersökningar med längre varaktighet bör djuren vägas minst en gång i veckan och när testperioden avslutas. Foderkonsumtionen bör mätas varje gång fodret ändras och minst en gång i veckan. Om testkemikalien tillförs via dricksvattnet bör även vattenkonsumtionen mätas vid varje byte av vatten och minst en gång i veckan. Djur som uppvisar icke-dödliga indikatorer på överdriven toxicitet bör avlivas innan testperioden avslutas och används vanligen inte för komet-analysen.

Vävnadsinsamling

Eftersom det är möjligt att undersöka induktion av brott på DNA-strängar (kometer) i praktiskt taget alla vävnader bör valet av de vävnader som ska samlas in tydligt motiveras och grundas på syftet med undersökningen samt eventuell befintlig ADME, gentoxicitet, cancerogenitet eller andra toxicitetsdata för de undersökta testkemikalierna. Viktiga faktorer för övervägande bör omfatta administreringsväg (baserat på sannolika mänskliga exponeringsvägar), förutsagd vävnadsdistribution och absorption, metabolismens funktion och möjlig verkningsmekanism för testkemikalierna. Levern är den vävnad som har undersökts oftast och som det finns mest data för. I avsaknad av bakgrundsinformation och om inga specifika vävnader av intresse identifieras är provtagning av levern

▼M7

motiverat eftersom levern är det primära organet för xenobiotisk metabolism och ofta exponeras starkt både för huvudämnen och metaboliter. I vissa fall kan granskning av en direkt kontaktpunkt (t.ex. den glandulära magsäcken eller tolvfingertarmen/tomtarmen för oralt administrerade kemikalier eller lungorna för kemikalier som inandas) vara mest relevant. Kompletterande eller alternativa vävnader bör väljas baserat på de särskilda syftena med testet men kan även vara användbara för att undersöka flera vävnader hos samma djur, under förutsättning att laboratoriet har visat att det är kvalificerat för sådana vävnader och för att hantera flera vävnader samtidigt.

Beredning av prover

För de processer som beskrivs i följande punkter (44–49) är det viktigt att alla lösningar eller stabila suspensioner används före sista förbrukningsdatum eller att nya lösningar bereds vid behov. I de följande punkterna anses även tidsåtgången för att i) avlägsna varje vävnad efter obduktion, ii) behandla varje vävnad i cell-/kärnsuspensioner, och iii) behandla suspensionen och bereda analysplattformarna vara kritiska variabler (se definitioner, tillägg 1). Godtagbar tidsåtgång för varje steg bör fastställas när metoden etableras och laboratoriet visar att det är kvalificerat för testet.

Djuren avlivas enligt gällande djurskyddslagstiftning och 3R-principerna vid lämpliga tidpunkter efter den sista behandlingen med testkemikalien. De utvalda vävnaderna avlägsnas och dissekeras och en del samlas in för undersökning med kometmetoden. En del av samma vävnad bör samtidigt skäras ut och placeras i formaldehydlösning eller lämpligt fixativ för en eventuell histopatologisk analys (se punkt 55) enligt standardmetoderna (12). Den vävnad som ska undersökas med kometmetoden placeras i en buffert för finfördelning, sköljs ordentligt med kall buffert för att avlägsna restblod och lagras i iskall buffert fram till behandlingen. Perfusion in situ kan också utföras, t.ex. för lever och njure.

Det finns många publicerade metoder för cell-/kärnisolering, bland annat finfördelning av vävnader som lever och njure, skrapning av slemhinneytor för matsmältningsorgan, homogenisering och enzymatisk nedbrytning. I JaCVAM-valideringsförsöket undersöktes endast isolerade celler. Därför är isolerade celler att föredra när metoden etableras så att laboratoriet kan hänvisa till JaCVAM-testdata för att visa att det är kvalificerat. Man har dock visat att inga större skillnader uppstod i försöksresultatet beroende på om man använde isolerade celler eller kärnor (8). Andra metoder för att isolera celler/kärnor (t.ex. homogenisering, finfördelning, enzymatisk nedbrytning och nätfiltrering) gav jämförbara resultat (55). Följaktligen kan antingen isolerade celler eller isolerade kärnor användas. Laboratoriet bör noggrant utvärdera och validera vävnadsspecifika metoder för isolering av enstaka celler/kärnor. Såsom diskuteras i punkt 40 kan vissa av de skador som leder till brott på DNA-strängen som detekteras med kometmetoden kan vara mycket kortvariga (52) (53). Vilken metod som än används för att bereda suspensionerna med enstaka celler/kärnor är det därför viktigt att vävnaderna behandlas så snart som möjligt efter avlivningen av djuren och att de förvaras under förhållanden som minskar avlägsnandet av skador (t.ex. genom förvaring i låg temperatur). Cellsuspensionerna bör hållas iskalla tills de är färdiga för användning, så att laboratoriet kan visa minimal variation mellan proverna och lämpliga positiva och negativa kontrollresponser.

▼M7

BEREDNING AV ANALYSPLATTFORMAR

Analysplattformarna bör beredas så snart som möjligt (helst inom en timme) efter beredningen av cellerna/kärnorna. Temperaturen och tidsintervallet mellan avlivning och beredningen av analysplattformar bör noggrant kontrolleras och valideras enligt laboratoriets betingelser. Den volym cellsuspension som tillsätts till agaros vid låg smältpunkt (vanligen 0,5–1,0 %) för att bereda analysplattformarna bör inte minska procentandelen av agaros med låg smältpunkt till mindre än 0,45 %. Optimal celltäthet fastställs med det bildanalyssystem som används för att registrera kometerna.

Lysering

Lyseringsbetingelserna är också en kritisk variabel. Den kan störa brott på strängar som är resultatet av specifika typer av DNA-modifieringar (vissa DNA-alkyleringar och DNA-addukter). Lyseringsbetingelserna bör därför hållas så konstanta som möjligt för alla analysplattformar i försöket. När analysplattformarna har beretts sänks de ned i kyld lyseringslösning i minst en timme (eller över natten) vid cirka 2–8 °C under dämpade ljusförhållanden, t.ex. gult ljus (eller ljusbeständighet), för att undvika exponering för vitt ljus som kan innehålla UV-komponenter. Efter denna inkubationsperiod sköljs analysplattformarna för att avlägsna rester av rengöringsmedel och salter före det alkaliska upplösningssteget. Detta kan göras med renat vatten, neutraliseringsbuffert eller fosfatbuffer. Elektroforesbuffert kan också användas. På så sätt upprätthålls de alkaliska förhållandena i elektroforeskammaren.

Upplösning och elektrofores

Analysplattformarna placeras slumpmässigt på plattformen på en elektroforesenhet av undervattenstyp som innehåller tillräckligt med elektroforeslösning så att analysplattformarnas ytor täcks fullständigt (täckdjupet bör också vara konsekvent mellan körningarna). I andra typer av elektroforesenheter för kometmetoden, dvs, med aktiv kylning, cirkulation och strömförsörjning av hög kapacitet kommer en högre lösningsmedelstäckning att leda till högre ström samtidigt som spänningen hålls konstant. En balanserad utformning bör användas för placeringen av analysplattformarna i elektroforestanken för att begränsa effekterna av eventuella trender eller en kanteffekt inom tanken och minimera skillnaderna mellan satserna, dvs. i varje elektroforeskörning. Därför bör antalet objektglas från varje djur i undersökningen vara detsamma och prover från olika doseringsgrupper och negativa och positiva kontroller bör inbegripas. Analysplattformarna bör lämnas i minst 20 minuter så att DNA:s kan lösa upp sig och sedan genomgå elektrofores under kontrollerade förhållanden som maximerar känsligheten och försökets dynamiska intervall (dvs. leda till godtagbara nivåer av procentandelen DNA i kometsvansar för negativa och positiva kontroller som maximerar sensitiviteten). Graden av DNA-migration associeras linjärt med elektroforesens varaktighet, och även med potentialen (V/cm). Baserat på JaCVAM-testet kan detta vara 0,7 V/cm i minst 20 minuter. Elektroforesens varaktighet anse vara en kritisk variabel och tiden bör därför ställas in för att optimera det dynamiska intervallet. Längre elektroforestider (t.ex. 30 eller 40 minuter för att maximera sensitiviteten) leder vanligen till starkare positiva responser med kända mutagener. Längre elektroforestider kan dock även leda till överdriven migration i kontrollproverna. Spänningen bör hållas konstant i varje försök och variationen i andra parametrar bör hållas inom ett snävt fastställt intervall. I JaCVAM-testet gav t.ex. 0,7 V/cm en startström på 300 mA. Buffertdjupet bör justeras för att uppnå erforderliga betingelser och upprätthållas under försöket. Strömmen i början och slutet av elektroforesperioden bör registreras. Optimala betingelser bör

▼M7

därför fastställas när det berörda laboratoriet visar att det är kvalificerat att hantera varje undersökt vävnad. Elektroforeslösningens temperatur under upplösning och elektrofores bör hållas låg, vanligen 2–10 °C (10). Elektroforeslösningens temperatur bör registreras i början av upplösningen, när elektroforesen inleds och i slutet av elektroforesen.

När elektroforesen har slutförts sänks analysplattformarna ned/sköljs i neutraliseringsbufferten i minst fem minuter. Ny gel kan färgas in och registreras som ”ny” (t.ex. inom 1–2 dagar) eller torkas ut för senare registrering (t.ex. inom 1–2 veckor efter infärgning) (56). Betingelserna bör dock valideras under kvalifikationsprocessen och historiska data bör inhämtas och registreras separat för varje betingelse. I det senare fallet torkas analysplattformarna ut genom nedsänkning i absolut etanol i minst fem minuter. Låt dem lufttorka. Därefter lagras de, antingen i rumstemperatur eller i en behållare i kylskåp, tills de registreras.

Mätmetoder

Kometer bör registreras kvantitativt med ett automatiskt eller halvautomatiskt bildanalyssystem. Analysplattformarna färgas in med lämplig fluorescerade färg, t.ex. SYBR Gold, Green I, propidiumjodid eller etidiumbromid, och mäts vid en lämplig förstoring (t.ex. 200 x) i ett mikroskop med epi-fluorescens och lämpliga detektorer eller en digital kamera (t.ex. CCD).

Cellerna kan klassificeras i tre kategorier enligt beskrivningen i atlasen över kometbilder (57), nämligen registrerbara, icke-registrerbara och ”hedgehog” (diskuteras närmare i punkt 56). För att undvika artefakter bör endast registrerbara celler (tydligt definierade komethuvuden och kometsvansar utan störning från närliggande celler) klassificeras för procentandel DNA i kometsvans. Frekvensen av icke-registrerbara celler behöver inte redovisas. Frekvensen av hedgehogs bör bestämmas baserat på visuell registrering (eftersom avsaknad av tydligt definierade komethuvuden och kometsvansar innebär att de inte kan upptäckas ordentligt med bildanalys) av minst 150 celler per prov (diskuteras närmare i punkt 56) och dokumenteras separat.

Alla analysplattformar, inklusive analysplattformar med positiva och negativa kontroller, bör ges en oberoende kodning och klassificeras ”blindade” så att bedömaren inte känner till behandlingsbetingelserna. Minst 150 celler bör analyseras för varje prov (per vävnad per djur) (exklusive hedgehogs – se punkt 56). Klassificering av 150 celler per djur för minst fem djur per dos (färre i den parallella positiva kontrollen – se punkt 29) ger lämplig statistisk kraft enligt analysen av Smith m.fl. 2008 (5). Om analysplattformar används kan cellerna komma från två eller tre analysplattformar som klassificerats per prov om fem djur per grupp används. Flera områden av analysplattformarna bör observeras vid en täthet som säkerställer att ingen överlappning av kometsvansarna förekommer. Klassificering vid analysplattformarnas kanter bör undvikas.

Brott på DNA-strängar i kometmetoden kan mätas med oberoende endpoints, t.ex. procentandel DNA i kometsvans, kometsvanslängd och kometsvansmoment. Samtliga tre mätningar kan göras om lämplig bildanalysprogramvara används. Procentandelen DNA i kometsvans (även benämnd *% tail intensity*, % intensitet i kometsvans) rekommenderas för utvärdering och tolkning av resultaten (12) (40) (41) (42) och bestäms av DNA-fragmentens intensitet i kometsvansen, uttryckt som procentandel av cellens totala intensitet (13).

▼M7

Vävnadsskada och cytotoxicitet

Positiva resultat i kometmetoden kanske inte enbart beror på gentoxicitet. Toxicitet i målvävnaderna kan även leda till ökad DNA-migration (12) (41). Omvänt förekommer låg eller måttlig cytotoxicitet ofta i samband med kända gentoxiner (12), vilket visar att det inte är möjligt att skilja mellan DNA-migration som inducerats av genotoxicitet och DNA-migration som inducerats av cytotoxicitet enbart i kometmetoden. Om ökningar i DNA-migrationen observeras bör man dock undersöka en eller flera indikatorer för cytotoxicitet, eftersom detta kan underlätta tolkningen av resultaten. Ökningar i DNA-migrationen bör tolkas med försiktighet om det finns tydliga bevis för cytotoxicitet.

Det finns många förslag på mått för cytotoxicitet, och bland dessa anses histopatologiska ändringar vara ett relevant mått på vävnadstoxicitet. Observationer såsom inflammation, cellinfiltrering och apoptotiska och nekrotiska ändringar har kopplats till ökningar i DNA-migrationen. Såsom visats av JaCVAM:s valideringsförsök (12) finns det dock ingen definitiv förteckning över histopatologiska ändringar som alltid kan kopplas till ökad DNA-migration. Förändringar av de kliniska kemimåtten (t.ex. AST, ALT) kan också ge användbar information om vävnadsskador och kompletterande indikatorer som kaspasaktivering, TUNEL-infärgning, Annexin V-infärgning osv. kan övervägas. Det finns dock begränsade publicerade data om användningen av det sistnämnda alternativet i in vivo-undersökningar och uppgifterna är inte alltid tillförlitliga.

Hedgehogs (eller moln, spökceller) är celler som uppvisar en mikroskopisk bild bestående av ett litet eller obefintligt huvud och långa diffusa kometsvansar. Dessa celler anses vara allvarligt skadade, även om etiologin för hedgehogs är osäker (se tillägg 3). På grund av utseendet är bildanalysmätningar av procentandelen DNA i kometsvans inte tillförlitliga för hedgehogs och de bör därför utvärderas separat. Förekomsten av hedgehogs bör registreras och redovisas. Eventuella relevanta ökningar som antas bero på testkemikalien bör undersökas och tolkas med försiktighet. Kunskap om testkemikaliernas eventuella verkningssätt kan vara till hjälp för sådana överväganden.

DATA OCH RAPPORTERING

Behandling av resultaten

Djuret är försöksenheten och därför ska både individuella data för djuren och sammanfattade resultat presenteras i tabellform. På grund av den hierarkiska datastrukturen bör medelvärdet för procentandelen DNAi kometsvans för varje analysplattform bestämmas och genomsnittet av medelvärdena beräknas för varje djur (12). Därefter bestäms medelvärden för individuella djur för att få fram ett medelvärde för gruppen. Alla dessa värden ska ingå i rapporten. Alternativa metoder (se punkt 53) kan användas om de är vetenskapligt och statistiskt motiverade. Den statistiska analysen kan utföras med hjälp av olika metoder (58) (59) (60) (61). Vid valet av statistisk metod bör man överväga behovet av omvandling (t.ex. log eller kvadratrot) av uppgifterna och/eller att lägga till en låg siffra (t.ex. 0,001) till alla värden (även icke-noll) för att begränsa effekten av nollcellvärden. Detta diskuteras i ovannämnda litteraturhänvisningar. Analysuppgifter för behandling/samverkan mellan könen när båda könen används samt den efterföljande dataanalysen med eller utan skillnader anges i tillägg 2. Uppgifter om toxicitet och kliniska tecken bör också rapporteras.

Kriterier för godkännande

Testet måste uppfylla följande kriterier för att godkännas:

a. Den parallella negativa kontrollen måste anses godtagbar för registrering i laboratoriets historiska databas över negativa kontroller enligt punkt 16.

▼M7

b. Parallella positiva kontroller (se punkt 29) bör framkalla reaktioner som överensstämmer med de kontroller som genereras i den historiska databasen över positiva kontroller och ge en statistiskt signifikant ökning jämfört med den parallella negativa kontrollen.

c. Ett tillräckligt antal celler och doser ska ha analyserats (punkterna 52 och 36–38).

d. Urvalskriterierna för högsta dos överensstämmer med de kriterier som beskrivs i punkt 36.

Utvärdering och tolkning av resultaten

Under förutsättning att samtliga acceptanskriterier är uppfyllda anses testkemikalien vara klart positiv om följande gäller:

a. Åtminstone en av testdoserna uppvisar en statistiskt signifikant ökning jämfört med den parallella negativa kontrollen.

b. Ökningen är dosrelaterad när den utvärderas med ett lämpligt trendtest.

c. Resultat faller utanför distributionen för historiska negativa kontrolldata för en viss art, vehikel, administreringsväg, vävnad och antal administreringar.

Om alla dessa kriterier är uppfyllda anses testkemikalien kunna inducera brott på DNA-strängar i de vävnader som undersöks i detta testsystem. Om endast ett eller två av dessa kriterier är uppfyllda, se punkt 62.

Under förutsättning att samtliga acceptanskriterier är uppfyllda anses testkemikalien vara klart negativ om följande gäller:

a. Ingen av testkoncentrationerna uppvisar en statistiskt signifikant ökning jämfört med den parallella negativa kontrollen.

b. Det finns ingen koncentrationsrelaterad ökning vid utvärdering med ett lämpligt trendtest.

c. Alla resultat faller inom distributionen för historiska negativa kontrolldata för en viss art, vehikel, administreringsväg, vävnad och antal administreringar.

d. Det finns direkta eller indirekta bevis som stöder exponering av målvävnaden eller dess toxicitet.

Testkemikalien anses inte kunna inducera brott på DNA-strängar i de vävnader som undersöks i detta testsystem.

Det finns inget krav på verifiering av ett tydligt positivt eller negativt svar.

Om responsen varken är klart negativ eller klart positiv (dvs. alla kriterier i punkt 59 eller 60 är inte uppfyllda) och för att göra det lättare att fastställa resultatets biologiska relevans bör uppgifterna fackgranskas och/eller undersökas ytterligare om det är vetenskapligt motiverat. Det kan även vara användbart att klassificera ytterligare celler (i förekommande fall) eller upprepa försöket, eventuellt med optimerade försöksbetingelser (t.ex. dosintervall, andra administreringsvägar, andra provtagningstillfällen eller andra vävnader).

I sällsynta fall är det, trots ytterligare undersökningar, inte möjligt att dra en slutsats om huruvida testkemikalien ger positiva eller negativa resultat och i dessa fall anses undersökningen vara tvetydig.

▼M7

För att bedöma den biologiska relevansen av ett positivt eller tvetydigt krävs information om cytotoxicitet i målvävnaden (se punkterna 54–55). Om positiva eller otvetydiga resultat endast observeras vid förekomst av tydliga bevis på cytotoxicitet anses undersökningsresultaten vara tvetydiga för gentoxicitet om det inte finns tillräckligt med information för en definitiv slutsats. Vid negativa undersökningsresultat där det finns tecken på toxicitet vid alla testade doser kan en ytterligare undersökning av icke-toxiska doser behövas.

Testrapport

Testrapporten ska innehålla följande information:

Testkemikalie:

— Ursprung, satsnummer om sådant finns.

— Testkemikaliens stabilitet, sista förbrukningsdatum eller sista datum för upprepad analys, om känt.

Monokomponentämne:

— Fysiskt utseende, vattenlöslighet och ytterligare relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper.

— Kemiska beteckningar, såsom IUPAC- eller CAS-beteckning, CAS-nummer, SMILES- eller InChI-kod, strukturell formel, renhet, kemisk beteckning på föroreningar i förekommande fall och om möjligt osv.

Multikomponentämne, UVCB och blandningar:

— Karakteriseras så långt som möjligt genom kemisk beteckning (se ovan), kvantitativ förekomst och relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper hos beståndsdelarna.

Lösningsmedel/vehikel:

— Motivering för valet av lösningsmedel/vehikel.

— Löslighet och stabilitet av testkemikalien i lösningsmedlet/vehikeln, om detta är känt.

— Beredning av doser.

— Analytiska bestämningar av beredningar (t.ex. stabilitet, homogenitet, nominella koncentrationer).

Försöksdjur:

— Använd art/stam och vetenskapliga och etiska motiveringar till valet.

— Djurens antal, ålder och kön.

— Ursprung, inhysning, foder, berikning osv.

— Individuell vikt hos försöksdjuren vid försökets början och slut, inklusive kroppsviktsintervall, medelvärde och standardavvikelse för varje grupp.

Testbetingelser:

— Positiva och negativa kontrolldata (vehikel/lösningsmedel).

▼M7

— Resultat från en preliminär undersökning (om en sådan utförs).

— Grund för valet av dosnivå.

— Uppgifter om beredning av testkemikalien.

— Uppgifter om administreringen av testkemikalien.

— Grund för administreringsväg.

— Injektionspunkt (för subkutana eller intravenösa undersökningar).

— Metoder för provberedning, i förekommande fall histopatologiska analyser, särskilt för kemikalier som ger positiv kometrespons.

— Grund för valet av vävnad.

— Metoder för att verifiera att testkemikalien nått målvävnaden eller den allmänna cirkulationen om negativa resultat erhålls.

— Faktisk dos (mg/kg kroppsvikt/dag) som beräknats genom dietens/dricksvattnets testkemikaliekoncentration (ppm) och konsumtion, i tillämpliga fall.

— Uppgifter om diet- och vattenkvalitet.

— Detaljerad beskrivning av behandlings- och provtagningsscheman samt motivering av valen (t.ex. toxikokinetiska data om sådana finns tillgängliga).

— Smärtlindringsmetod, bedövningsmedel.

— Metod för avlivning.

— Förfaranden för att isolera och bevara vävnader.

— Metoder för beredning av suspensioner med enstaka celler/kärnor.

— Ursprung och partinummer för alla reagenser (om möjligt).

— Utvärderingsmetoder för cytotoxicitet.

— Elektroforesbetingelser.

— Färgningstekniker.

— Metoder för klassificering och mätning av kometer.

Resultat:

— Allmänna kliniska observationer i förekommande fall, före och under testperioden för varje djur.

— Bevis på cytotoxicitet i förekommande fall.

▼M7

— För undersökningar som varar längre än en vecka: individuell vikt under försöket, inklusive kroppsviktsintervall, medelvärde och standardavvikelse för varje grupp samt foderkonsumtion.

— Dos-responsförhållande, då detta är uppenbart.

— För varje vävnad/djur, procentandel DNAi kometsvans (eller andra mått i förekommande fall) samt medelvärden per analysplattform, medelvärden per djur och medelvärden per grupp.

— Parallella och historiska negativa kontrolldata med omfång, medelvärden/medianvärden och standardavvikelser för varje utvärderad vävnad.

— Parallella och historiska positiva kontrolldata.

— För andra vävnader än lever, en dos-responskurva utifrån den positiva kontrollen. Dos-responskurvan kan tas fram från data som samlats in under kvalifikationsprocessen (se punkterna 16–17) och bör åtföljas av en motivering med hänvisningar till aktuell litteratur, för att visa att omfattningen och spridningen av responser på kontroller hos vävnaden i fråga är lämpliga.

— Statistiska analyser och metoder samt kriterier för bedömning av responsen som positiv, negativ eller tvetydig.

— Frekvens av hedgehogs i varje grupp och per djur.

Diskussion av resultaten.

Slutsats

Litteraturhänvisningar

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, s. 114–132.

(2) Brendler-Schwaab, S. m.fl. (2005), The *in vivo* Comet assay: use and status in genotoxicity testing, *Mutagenesis*, vol. 20/4, s. 245–254.

(3) Burlinson, B. m.fl. (2007), Fourth International Workgroup on Genotoxicity Testing: result of the *in vivo* Comet assay workgroup, *Mutation Research*, vol. 627/1, s. 31-5.

(4) Burlinson, B. (2012), The *in vitro* and *in vivo* Comet assays, *Methods in Molecular Biology*, vol. 817, s. 143–163.

(5) Smith, C.C. m.fl. (2008), Recommendations for design of the rat Comet assay, *Mutagenesis*, vol. 23/3, s. 233–240.

(6) Hartmann, A. m.fl. (2003), Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay, *Mutagenesis*, vol. 18/1, s. 45–51.

(7) McKelvey-Martin, V.J. m.fl. (1993), The single cell gel electrophoresis assay (Comet assay): a European review, *Mutation Research*, vol. 288/1, s. 47–63.

(8) Tice, R.R. m.fl. (2000), Single cell gel/Comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, vol. 35/3, s. 206–221.

▼M7

(9) Singh, N.P. m.fl. (1988), A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, *Experimental Cell Research*, vol. 175/1, s. 184–191.

(10) Rothfuss, A. m.fl. (2010), Collaborative study on fifteen compounds in the rat-liver Comet assay integrated into 2- and 4-week repeat-dose studies, *Mutation Research*, vol., 702/1, s. 40–69.

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

(12) OECD (2014), *Reports of the JaCVAM initiative international pre-validation and validation studies of the in vivo rodent alkaline comet assay for the detection of genotoxic carcinogens*, Series on Testing and Assessment, nr 195 och 196, OECD Publishing, Paris.

(13) Olive, P.L., J.P. Banath, R.E. Durand (1990), Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells using the ”Comet” assay, *Radiation Research*, vol. 122/1, s. 86–94.

(14) Tice, R.R., G.H. Strauss (1995), The single cell gel electrophoresis/Comet assay: a potential tool for detecting radiation-induced DNA damage in humans, *Stem Cells*, vol. 13/1, s. 207–214.

(15) Collins, A.R (2004), The Comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations, *Molecular Biotechnology*, vol. 26/3, s. 249–261.

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

(17) Kushwaha, S. m.fl. (2010), Evaluation of multi-organ DNA damage by Comet assay from 28 days repeated dose oral toxicity test in mice: A practical approach for test integration in regulatory toxicity testing, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, vol. 58/1, s. 145–54.

(18) Vasquez, M.Z. (2010), Combining the *in vivo* Comet and micronucleus assays: a practical approach to genotoxicity testing and data interpretation, *Mutagenesis*, vol. 25/2, s. 187–99.

(19) Bowen, D.E. (2011), Evaluation of a multi-endpoint assay in rats, combining the bone-marrow micronucleus test, the Comet assay and the flow-cytometric peripheral blood micronucleus test, *Mutation Research*, vol. 722/1, s. 7–19.

(20) Recio, L. m.fl. (2010), Dose-response assessment of four genotoxic chemicals in a combined mouse and rat micronucleus (MN) and Comet assay protocol, *The Journal of Toxicological Science*, vol. 35/2, s. 149–162.

(21) O'Donovan, M., B. Burlinson (2013), Maximum dose levels for the rodent comet assay to examine damage at the site of contact or to the gastrointestinal tract, *Mutagenesis*, vol. 28/6, s. 621–623.

(22) Hartmann, A. (2004), **Use of the alkaline *in vivo* Comet assay for mechanistic genotoxicity investigations,** *Mutagenesis*, vol. 19/1, s. 51–59.

(23) Nesslany, F. (2007), *In vivo* Comet assay on isolated kidney cells to distinguish genotoxic carcinogens from epigenetic carcinogens or cytotoxic compounds, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, vol. 630/1, s. 28–41.

(24) Brendler-Schwaab, S.Y., B.A. Herbold (1997), A new method for the enrichment of single renal proximal tubular cells and their first use in the Comet assay, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, vol. 393/1-2, s. 175–178.

▼M7

(25) Toyoizumi, T. m.fl. (2011), Use of the *in vivo* skin Comet assay to evaluate the DNA-damaging potential of chemicals applied to the skin, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, vol. 726/2, s. 175–180.

(26) Struwe, M. m.fl. (2008), Detection of photogenotoxicity in skin and eye in rat with the photo Comet assay, *Photochemical and Photobiological Sciences*, vol. 7/2, s. 240–249.

(27) Wada, K. m.fl. (2012), A comparison of cell-collecting methods for the Comet assay in urinary bladders of rats, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, vol. 742/1-2, s. 26–30.

(28) Wang, A. m.fl. (2007), Measurement of DNA damage in rat urinary bladder transitional cells: improved selective harvest of transitional cells and detailed Comet assay protocols, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, vol. 634/ 1-2, s. 51–59.

(29) Burlinson, B. m.fl. (2007), *In Vivo* Comet Assay Workgroup, part of the Fourth International Workgroup on Genotoxicity Testing. Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: results of the *in vivo* Comet assay workgroup, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, vol. 627/1, s. 31–35.

(30) Jackson, P. m.fl. (2012), Pulmonary exposure to carbon black by inhalation or instillation in pregnant mice: effects on liver DNA strand breaks in dams and offspring, *Nanotoxicology*, vol. 6/5, s. 486–500.

(31) Sasaki, Y.F. m.fl. (2000), The comet assay with multiple mouse organs: comparison of Comet assay results and carcinogenicity with 208 chemicals selected from the IARC monographs and U.S. NTP Carcinogenicity Database, *Critical Reviews in Toxicology*, vol. 30/6, s. 629–799.

(32) Sekihashi, K. m.fl. (2002), Comparative investigations of multiple organs of mice and rats in the Comet assay, *Mutation Research*, vol. 517/1-2, s. 53–74.

(33) Speit, G, M. Vasquez, A. Hartmann (2009), **The comet assay as an indicator test for germ cell genotoxicity,** *Mutation Research*, vol. 681/1, s. 3–12.

(34) Zheng, H., P.L. Olive (1997), Influence of oxygen on radiation-induced DNA damage in testicular cells of C3H mice, *International Journal of Radiation Biology*, vol. 71/3, s. 275–282.

(35) Cordelli, E. m.fl. (2003), Evaluation of DNA damage in different stages of mouse spermatogenesis after testicular X irradiation, *Journal of Radiation Research*, vol. 160/4, s. 443–451.

(36) Merk, O., G. Speit (1999), Detection of crosslinks with the Comet assay in relationship to genotoxicity and cytotoxicity, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, vol. 33/2, s. 167–72.

(37) Pfuhler, S., H.U. Wolf (1996), Detection of DNA-crosslinking agents with the alkaline Comet assay, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, vol. 27/3, s. 196–201.

(38) Wu, J.H., N.J. Jones (2012), Assessment of DNA interstrand crosslinks using the modified alkaline Comet assay, *Methods in Molecular Biology*, vol. 817, s. 165–181.

(39) Spanswick, V.J., J.M. Hartley, J.A. Hartley (2010), **Measurement of DNA interstrand crosslinking in individual cells using the Single Cell Gel Electrophoresis (Comet) assay,** *Methods in Molecular Biology*, vol. 613, s. 267–282.

▼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), s. 7–16.

(41) Burlinson, B. m.fl. (2007), Fourth International Workgroup on Genotoxicity Testing: result of the *in vivo* Comet assay workgroup, *Mutation Research*, vol.627/1, s. 31–35.

(42) Kumaravel, T.S. m.fl. (2009), Comet Assay measurements: a perspective, *Cell Biology and Toxicology*, vol. 25/1, s. 53–64.

(43) Ersson, C., L. Möller (2011), The effects on DNA migration of altering parameters in the Comet assay protocol such as agarose density, electrophoresis conditions and durations of the enzyme or the alkaline treatments, *Mutagenesis*, vol. 26/6, s. 689–695.

(44) Møller, P. m.fl. (2010), Assessment and reduction of Comet assay variation in relation to DNA damage: studies from the European Comet Assay Validation Group, *Mutagenesis*, vol. 25/2, s. 109–111.

(45) Forchhammer, L. m.fl. (2010), Variation in the measurement of DNA damage by Comet assay measured by the ECVAG inter-laboratory validation trial, *Mutagenesis*, vol. 25/2, s. 113–123.

(46) Azqueta, A. m.fl. (2011), Towards a more reliable comet assay: Optimising agarose concentration, unwinding time and electrophoresis conditions, *Mutation Research*, vol. 724/1-2, s. 41–45.

(47) Hayashi, M. m.fl. (2011), Compilation and use of genetic toxicity historical control data, *Mutation Research*, vol. 723/2, s. 87–90.

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

(49) Appendix A of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS nr 123).

(50) Kapitel B.8 i denna bilaga: Subakut inhalationstoxicitet: 28-dagars studie.

(51) Kapitel B.29 i denna bilaga: Subkronisk inhalationstoxicitet: 90-dagars studie.

(52) Blakey, D.H., G.R. Douglas (1984), Transient DNA lesions induced by benzo[a]pyrene in Chinese hamster ovary cells, *Mutation Research*, vol. 140/2-3, s. 141–145.

(53) Blakey, D.H., G.R. Douglas (1990), The role of excision repair in the removal of transient benzo[a]pyrene-induced DNA lesions in Chinese hamster ovary cells, *Mutation Research*, vol. 236/1, s. 35–41.

(54) OECD (2002), ”Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation”, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 19, OECD Publishing, Paris.

(55) Nakajima, M. (2012), Tissue sample preparation for *in vivo* rodent alkaline Comet assay, *Genes and Environment*, vol. 34/1, s. 50–54.

(56) Hartmann, A. m.fl. (2003), Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay, *Mutagenesis*, vol.18/1, s.45–51.

(57) Atlas of Comet Assay Images, Scientist Press Co., Ltd., Tokyo, Japan.

(58) Lovell, D.P., G. Thomas, R. Dubow (1999), Issues related to the experimental design and subsequent statistical analysis of *in vivo* and *in vitro* Comet studies, *Teratogenesis Carcinogenesis Mutagenesis*, vol. 19/2, s. 109–119.

▼**M7**

(59) Wiklund, S.J., E. Agurell (2003), Aspects of design and statistical analysis in the Comet assay, *Mutagenesis*, vol. 18/2, s. 167–175.

(60) Bright, J. m.fl. (2011), Recommendations on the statistical analysis of the Comet assay, *Pharmaceutical Statistics*, vol. 10/6, s. 485–493.

(61) Lovell, D.P., T. Omori (2008), Statistical issues in the use of the Comet assay, *Mutagenesis*, vol. 23/3, s. 171–182.

▼M7

Tillägg 1

DEFINITIONER

Alkaline single cell gel electrophoresis (enkelcell-gelelektrofores under alkaliska betingelser): känslig teknik för detektion av primära DNA-skador i individuella celler/kärnor.

Kemikalie: ett ämne eller en blandning.

Komet: den form som nukleoider antar efter att ha utsatts för ett elektroforesfält. Namnet beror på att de liknar kometer: komethuvudet är kärnan och kometsvansen består av DNA som migrerar ut från kärnan i det elektriska fältet.

Kritisk variabel/parameter: protokollvariabel för vilken en liten ändring kan ha stor inverkan på försökets slutsatser. Kritiska variabler kan vara vävnadsspecifika. De kritiska variablerna bör inte ändras, särskilt inte inom ett test, utan att man först överväger hur ändringen kommer att påverka försöksresponsen, t.ex. enligt omfattning och variabilitet i de positiva och negativa kontrollerna. Ändringar av kritiska variabler som gjorts under testet eller jämfört med laboratoriets standardprotokoll ska anges i testrapporten och varje ändring ska motiveras.

Intensitet i kometsvans eller procentandel DNA i kometsvans (Tail intensity eller % tail DNA): motsvarar intensiteten i kometsvansen i förhållande till total intensitet (komethuvud plus kometsvans). Avspeglar antalet DNA-brott, uttryckt i procent.

Testkemikalie: alla ämnen eller blandningar som testas med denna testmetod.

UVCB-ämne: ämne med okänd eller varierande sammansättning, komplexa reaktionsprodukter och biologiskt material.

▼M7

Tillägg 2

UTFORMNING AV FAKTORFÖRSÖK FÖR IDENTIFIERING AV SKILLNADER MELLAN KÖNEN I IN VIVO COMET ASSAY

Utformning och analys av faktorförsök

I denna utformning testas minst fem hanar och fem honor vid varje koncentrationsnivå, vilket innebär att minst 40 djur måste användas (20 hanar och 20 honor plus relevanta positiva kontroller).

Detta är ett av de enklaste faktorförsöken och det motsvarar en tvåvägs-variansanalys med kön och koncentrationsnivå som huvudsakliga effekter. Data kan analyseras med hjälp av många vanliga statistiska programvarupaket såsom SPSS, SAS, STATA, Genstat samt med hjälp av R.

Analysen delar upp variationen i datauppsättningen mellan kön, koncentrationer och interaktionen mellan kön och koncentrationer. Var och en av termerna testas mot en uppskattning av variationerna mellan replikatdjuren inom djurgrupper av samma kön som ges samma koncentration. Fullständig information om den underliggande metoden finns i många statistiska läroböcker (se litteraturhänvisningar) och i hjälpavsnitt i statistiska paket.

Nästa steg i analysen är att kontrollera interaktionstermen ”kön x koncentration” i ANOVA tabellen ([1]). I avsaknad av en signifikant interaktionsterm ger de kombinerade värdena mellan könen eller koncentrationsnivåerna giltiga statistiska test mellan nivåerna, baserat på den sammanslagna inomgruppsvariationen enligt ANOVA.

Nästa steg i analysen är att dela upp uppskattningen av variationen mellan koncentrationerna i kontraster, som möjliggör ett test avseende linjära och kvadratiska kontraster i responsen mellan koncentrationsnivåerna. Om en signifikant variation i kön x koncentration förekommer kan även denna term delas upp i interaktionskontraster enligt följande: linjära kontraster x kön och kvadratiska kontraster x kön. Med hjälp av dessa termer kan man testa om koncentrationsresponsen är parallell för de två könen eller om den skiljer sig åt.

Uppskattningen av den sammanslagna inomgruppsvariationen kan användas för parvisa test av skillnaderna mellan medelvärdena. Dessa jämförelser kan göras mellan medelvärdena för könen och medelvärdena för de olika koncentrationsnivåerna, t.ex. för jämförelser med de negativa kontrollnivåerna. Om det finns en signifikant interaktion kan man jämföra medelvärden för olika koncentrationer för samma kön eller medelvärden för båda könen vid samma koncentration.

Litteraturhänvisningar

Teori, utformning, metod, analys och tolkning av faktorförsök diskuteras i många statistiska läroböcker, från den enklaste tvåfaktorsanalysen till mer komplexa former som används i försöksutformningsmetoder. Följande förteckning är icke-uttömmande: Vissa böcker innehåller etablerade exempel på jämförbara utformningar, i vissa fall med koder för att köra analysen med hjälp av olika programvarupaket.

([1]) Statistiker som använder modelleringsmetoder som allmänna linjära modeller (GLM) kan använda analysen på ett annorlunda men jämförbart sätt. Det är inte nödvändigt att härleda den traditionella ANOVA-modellen, som bygger på algoritmiska metoder för statistisk beräkning som utvecklades före dataåldern.

▼M7

(1) Box, G.E.P, Hunter, W.G. och 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. och 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 och Hamada, M.S. (2009) Experiments: Planning, Analysis and Optimization. John Wiley & Sons Inc.

▼M7

Tillägg 3

AKTUELLA BEGRÄNSNINGAR HOS FÖRSÖKET

På grund av nuvarande kunskapsstatus har kometmetoden flera begränsningar. Det förväntas att dessa begränsningar kommer att minskas eller definieras mer snävt allteftersom erfarenheterna av tillämpningen av försöket ökar för att bemöta säkerhetsfrågor i lagstiftningssammanhang.

1. Vissa typer av DNA-brott kan vara kortlivade, dvs. kan repareras för snabbt för att kunna observeras 24 timmar eller senare efter den sista dosen. Det saknas uppgifter om typerna av kortlivade skador och de kemikalier som kan orsaka sådana skador. Den tidsperiod då denna typ av skada kan detekteras är inte heller känd. Optimala provtagningstillfällen kan även vara specifika för kemikalien eller administreringsvägen och bör därför fastställas med utgångspunkt i kinetiska data (t.ex. den tidpunkt (T_{max}) då högsta värde för plasma eller vävnadskoncentration (C_{max}) uppnås) om sådana data finns tillgängliga. Enligt de flesta valideringsstudier som stöder denna testmetod bör obduktion utföras två eller tre timmar efter administreringen av slutdosen. Enligt de flesta studier i den publicerade litteraturen bör slutdosen ges mellan två och sex timmar före avlivning. Dessa erfarenheter användes som underlag för testmetodens rekommendation att slutdosen, om inte annat anges i tillgängliga data, bör administreras vid en angiven tidpunkt mellan två och sex timmar före obduktion.

2. Det finns inga uppgifter om testets känslighet för detektion av kortlivade DNA-skador efter administrering i foder eller dricksvatten jämfört med administrering via sond. DNA-skador har detekterats efter administrering i foder och dricksvatten, men det finns relativt få sådana rapporter jämfört med den mycket större erfarenheten av administrering via sond eller intraperitonealt (i.p.). Försökets känslighet kan därför minskas för kemikalier som inducerar kortlivad skada och som administreras via föda eller dricksvatten.

3. Inga interlaborativa undersökningar har utförts av andra vävnader än lever och magsäck. Därför saknas rekommendationer om hur en känslig och reproducerbar respons uppnås i andra vävnader än lever, t.ex. förväntade positiva och negativa kontrollintervall. För lever har man inte kunnat enas om att fastställa en lägre gräns även för det negativa kontrollvärdet.

4. Även om flera publikationer visar på en störande effekt på cytotoxicitet in vitro finns mycket få in vivo-data, och därför kan inget särskilt cytotoxicitetsmått rekommenderas. Histopatologiska förändringar såsom inflammation, cellinfiltration och apoptotiska och nekrotiska ändringar har kopplats till ökningar i DNA-migrationen. Såsom visats av JaCVAM:s valideringsförsök (OECD, 2014) leder dessa ändringar inte alltid till positiva komet-resultat och därför finns ingen definitiv förteckning över histopatologiska ändringar som alltid kan kopplas till ökad DNA-migration. Hedgehogs (eller moln, spökceller) har tidigare föreslagits som en indikator på cytotoxicitet, men etiologin för hedgehogs är osäker. Det finns data som tyder på att de kan orsakas av kemikalierelaterad cytotoxicitet, mekanisk/enzyminducerad skada som uppstår under provberedningen (Guerard m.fl., 2014) och/eller en mer extrem effekt av testkemikaliens gentoxicitet. Andra data tyder på att de beror på omfattande men kanske reparerbar DNA-skada (Lorenzo m.fl., 2013).

▼M7

5. Vävnader och cellkärnor har med framgång frysts ned för senare analys. Detta leder vanligen till en mätbar effekt av responsen på vehikeln och den positiva kontrollen (Recio m.fl., 2010; Recio m.fl., 2012, Jackson m.fl., 2013). Om nedfrysning används ska laboratoriet visa att det är kvalificerat för frysningsmetoder och bekräfta godtagbara låga intervall för procentandelen DNA i kometsvans i målvävnaderna hos vehikelbehandlade djur samt att positiva responser fortfarande kan detekteras. Olika metoder för nedfrysning av vävnader beskrivs i litteraturen. För närvarande råder det dock inte enighet om det bästa sättet att frysa ned och tina upp vävnader och hur man bedömer huruvida en eventuellt ändrad respons kan påverka testets sensitivitet.

6. Nya uppgifter visar att förteckningen över kritiska variabler kommer att bli kortare och parametrarna för kritiska variabler mer exakt definierade (Guerard m.fl., 2014).

Litteratur

(1) Guerard, M., C. Marchand, U. Plappert-Helbig (2014), Influence of Experimental Conditions on Data Variability in the Liver Comet Assay, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, vol. 55/2, s. 114–121.

(2) Jackson, P. m.fl. (2013), Validation of use of frozen tissues in high-throughput comet assay with fully-automatic scoring, *Mutagenesis*, vol. 28/6, s. 699–707.

(3) Lorenzo,Y. m.fl. (2013), **The comet assay, DNA damage, DNA repair and cytotoxicity: hedgehogs are not always dead**, *Mutagenesis*, vol. 28/4, s. 427–432.

(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, nr 195 och 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.* 35:149–162.

(6) Recio, L. m.fl. (2012), Comparison of Comet assay dose-response for ethyl methanesulfonate using freshly prepared versus cryopreserved tissues, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, vol. 53/2, s. 101–113.

▼B

DEL C: METODER FÖR BESTÄMNING AV EKOTOXICITET

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

C.1	AKUT TOXICITET FÖR FISK
C.2	TEST AV AKUT IMMOBILISERING AV *DAPHNIA*-ARTER
C.3	BESTÄMNING AV TILLVÄXTHÄMNING HOS SÖTVATTENSALGER OCH CYANOBAKTERIER
C.4	BESTÄMNING AV ”LÄTT” BIONEDBRYTBARHET
DEL 1	ALLMÄNNA PRINCIPER
DEL 2	DOC-ELIMINERING (DOC DIE-AWAY) (metod C.4-A)
DEL 3	MODIFIERAT OECD-SCREENINGTEST (metod C.4-B)
DEL 4	CO_2-UTVECKLING (metod C.4-C)
DEL 5	MANOMETRISK RESPIROMETRITEST (metod C.4-D)
DEL 6	CLOSED BOTTLE-TEST (metod C.4-E)
DEL 7	MITI TEST (metod C.4-F)
C.5	NEDBRYTNING – BIOKEMISK SYREFÖRBRUKNING
C.6	NEDBRYTNING – KEMISK SYREFÖRBRUKNING
C.7	NEDBRYTNING – ABIOTISK NEDBRYTNING: HYDROLYS SOM FUNKTION AV PH
C.8	TOXICITET HOS DAGGMASKAR
C.9	BIOLOGISK NEDBRYTBARHET: ZAHN-WELLENS TEST
C.10	SIMULATIONSTEST AEROB AVLOPPSVATTENBEHANDLING C.10-A: ENHETERNA FÖR AKTIVERAT SLAM – C.10-B BIOFILMER
C.11	RESPIRATIONSHÄMNINGSTEST FÖR AKTIVERAT SLAM (KOL- OCH AMMONIUMOXIDATION)
C.12	BIOLOGISK NEDBRYTBARHET: MODIFIERAT SCAS-TEST
C.13	BIOACKUMULERING I FISK: EXPONERING VIA VATTEN OCH FÖDA
C.14	TILLVÄXTTEST PÅ UNGA EXEMPLAR AV FISK
C.15	FISK, KORTTIDSTEST AVSEENDE TOXICITET PÅ *EMBRYO*-OCH SÄCKYNGELSTADIERNA
C.16	HONUNGSBIN – TEST AVSEENDE AKUT TOXICITET (ORALT)
C.17	HONUNGSBIN – TEST AVSEENDE AKUT TOXICITET (KONTAKT)
C.18	BESTÄMNING AV ADSORPTION OCH DESORPTION I JORD VID JÄMVIKT I UPPSLAMMAT JORDPROV

▼B

C.19	UPPSKATTNING AV ADSORPTIONSKOEFFICIENT (K_{OC}) I JORD OCH AVLOPPSSLAM MED ANVÄNDNING AV HÖGTRYCKSVÄTSKEKROMATOGRAFI (HPLC)
C.20	REPRODUKTIONSTEST PÅ *DAPHNIA MAGNA*
C.21	JORDLEVANDE MIKROORGANISMER: TEST RÖRANDE OMVANDLING AV KVÄVE
C.22	JORDLEVANDE MIKROORGANISMER: TEST RÖRANDE OMVANDLING AV KOL
C.23	AEROB OCH ANAEROB OMVANDLING I JORD
C.24	AEROB OCH ANAEROB OMVANDLING I AKVATISKA SEDIMENTSYSTEM
C.25	AEROB MINERALISERING I YTVATTEN – SIMULERINGSTEST AV BIOLOGISK NEDBRYTNING
C.26	BESTÄMNING AV TILLVÄXTHÄMNING HOS *LEMNA*-ARTER (ANDMAT)
C.27	TOXICITETSTEST I SEDIMENT- OCH VATTENFAS PÅ CHIRONOMIDLARVER MED SPIKAT SEDIMENT
C.28	TOXICITETSTEST I SEDIMENT- OCH VATTENFAS PÅ CHIRONOMID-LARVER MED SPIKAT VATTEN
C.29	LÄTT BIONEDBRYTBARHET – CO_2 I FÖRSLUTNA KÄRL (Headspace-test)
C.30	BIOACKUMULERING I JORDLEVANDE OLIGOCHAETER (FÅBORSTMASKAR)
C.31	TEST PÅ LANDVÄXTER: TEST AV GRODDPLANTORS UTVECKLING OCH TILLVÄXT
C.32	REPRODUKTIONSTEST FÖR SMÅRINGMASKAR (ENCHYTRAEIDAE)
C.33	REPRODUKTIONSTEST FÖR DAGGMASKAR (*EISENIA FETIDA* OCH *EISENIA ANDREI*)
C.34	BESTÄMNING AV HÄMNINGEN AV DEN ANAEROBA BAKTERIEAKTIVITETEN – MINSKNINGEN AV GASPRODUKTIONEN FRÅN ANAEROBT SLAM (AVLOPPSVATTEN) SOM GENOMGÅR RÖTNING
C.35	TOXICITETSTEST I SEDIMENT- OCH VATTENFAS FÖR *LUMBRICULUS* MED SPIKAT SEDIMENT
C.36	REPRODUKTIONSTEST FÖR ROVKVALSTER (*HYPOASPIS* (*GEOLAELAPS*) *ACULEIFER*) I JORD
C.37	21-DAGARS TEST PÅ FISK: EN KORTSIKTIG SCREENING FÖR ÄMNEN MED ÖSTROGEN OCH ANDROGEN AKTIVITET SAMT AROMATASHÄMMANDE VERKAN
C.38	TEST PÅ GRODDJURSMETAMORFOS
C.39	REPRODUKTIONSTEST FÖR HOPPSTJÄRTAR I JORD

▼B

C.40	TOXICITETSTEST I SEDIMENT- OCH VATTENFAS PÅ CHIRONOMIDLARVER MED SPIKAT SEDIMENT ELLER SPIKAT VATTEN
C.41	TEST PÅ FISKARS KÖNSUTVECKLING
C.42	BIOLOGISK NEDBRYTBARHET I HAVSVATTEN
C.43	ANAEROB BIOLOGISK NEDBRYTBARHET AV ORGANISKA ÄMNEN I RÖTSLAM: GENOM MÄTNING AV GASPRODUKTIONEN
C.44	URLAKNING I JORDKOLONNER
C.45	UPPSKATTNING AV UTSLÄPP FRÅN TRÄSKYDDSBEHANDLAT VIRKE TILL MILJÖN: LABORATORIEMETOD FÖR TRÄBASERADE RÅVAROR SOM INTE ÄR TÄCKTA OCH SOM ÄR I KONTAKT MED SÖTVATTEN ELLER HAVSVATTEN
C.46	BIOACKUMULERING I SEDIMENTLEVANDE BOTTENLEVANDE OLIGOCHAETER
C.47	TOXICITETSTEST PÅ FISK I TIDIGA LEVNADSSTADIER
C.48	KORTTIDSTEST AV REPRODUKTION HOS FISK
C.49	AKUT TOXICITETSTEST PÅ FISKEMBRYO (FET)
C.50	TOXICITETSTEST UTAN SEDIMENT PÅ *MYRIOPHYLLUM SPICATUM*
C.51	TOXICITETSTEST MED VATTEN–SEDIMENT PÅ *MYRIOPHYLLUM SPICATUM*

▼B

C.1 AKUT TOXICITET FÖR FISK

1. METOD

1.1 INLEDNING

Syftet med detta test är att bestämma ett ämnets akuta dödliga toxicitet för sötvattenfisk. Det är värdefullt att känna till ämnets löslighet i vatten, ångtryck, kemiska stabilitet, dissociationskonstanter och bionedbrytbarhet när man ska välja den mest lämpliga testmetoden (statisk, semistatisk eller genomströmning) för att säkerställa tillfredsställande konstanta koncentrationer av testämnet under hela testperioden.

Vid planeringen av testet och tolkningen av testresultaten bör man ta hänsyn till andra uppgifter (t.ex. strukturformel, renhetsgrad, art och procentdel av signifikanta orenheter, förekomst och mängd av tillsatser, samt n-oktanol/vattendelningskoefficienten).

1.2 DEFINITIONER OCH ENHETER

Akut toxicitet är de märkbara skadliga verkningar som på kort tid (dagar) framkallas hos en organism som exponeras för ett ämne. I detta test uttrycks akut toxicitet som median letal koncentration (LC_{50}), dvs. den koncentration i vatten som medför att 50 % av fiskarna i en försöksgrupp dör under kontinuerlig exponering i en viss tid. Exponeringstiden ska anges.

Alla koncentrationer av testämnet anges i vikt per volymenhet (milligram per liter). De kan också uttryckas som vikt per vikt (mg/kg^{-1}).

1.3 REFERENSÄMNEN

Ett referensämne kan användas för att visa att försöksdjurens respons inte har ändrats signifikant under testbetingelserna i laboratoriet.

Inga referensämnen finns angivna för detta test.

1.4 TESTMETODSPRINCIP

Ett gränstest kan utföras med 100 mg per liter för att konstatera om LC_{50} är större än denna koncentration.

Fisken exponeras för testämnet som i en rad koncentrationer tillsätts vattnet under 96 timmar. Dödligheten registreras med högst 24 timmars mellanrum och om så är möjligt beräknas de koncentrationer som vid varje observationstillfälle har medfört att 50 % av fisken (LC_{50}) har dött.

1.5 KVALITETSKRITERIER

Kvalitetskriterierna gäller för såväl gränstestet som den fullständiga testmetoden.

Dödligheten i kontrollgruppen får inte överstiga 10 % (eller 1 fisk om färre än 10 fiskar används) i slutet av testet.

Under hela testet ska koncentrationen av upplöst syre vara högre än 60 % av luftmättnadsvärdet.

▼B

Koncentrationer av testämnet ska ligga över 80 % av startkoncentrationen under hela testperioden.

För ämnen som är lättlösliga i testmediet och ger stabila lösningar, dvs. ämnen som inte i hög grad förångas, bryts ned, hydrolyseras eller adsorberas, kan startkoncentrationen antas vara lika med den nominella koncentrationen. Man ska kunna bevisa att koncentrationen har bibehållits under hela testet och att kvalitetskriterierna är uppfyllda.

För ämnen som är

i) svårlösliga i testmediet, eller

ii) kan skapa stabila emulsioner eller dispersioner, eller

iii) är ostabila i vattniga lösningar

ska man som värde för startkoncentrationen använda den koncentration som är uppmätt i lösningen (eller om detta inte är tekniskt möjligt, mätt i vattenkolonnen) vid testets inledning. Koncentrationen bestäms sedan jämvikt uppnåtts, men innan fisken släpps i.

I alla dessa fall ska ytterligare mätningar göras under testets gång för att säkerställa att koncentrationen har bibehållits och att kvalitetskriterierna har varit uppfyllda.

pH-värdet får inte variera med mer än 1 enhet.

1.6. METODBESKRIVNING

Tre typer av förfaranden kan användas:

Statiskt test:

Toxicitetstest utan något genomflöde av testlösningen. (Lösningarna förblir oförändrade under hela testet.)

Semi-statiskt test:

Test utan genomflöde av testlösningen men där hela testlösningar regelbundet byts ut helt efter längre perioder (t.ex. 24 timmar).

Genomströmningstest:

Toxicitetstest där vattnet i testkamrarna förnyas hela tiden och där testämnet transporteras med det vatten som används till att förnya testmediet.

1.6.1 **Reagenser**

1.6.1.1 *Lösningar av testämnen*

Stamlösningar av erforderlig styrka framställs genom att testämnet upplöses i avjoniserat vatten eller vatten enligt 1.6.1.2.

De valda testkoncentrationerna framställs genom utspädning av stamlösningen. Om höga koncentrationer testas kan ämnet lösas direkt i utspädningsvattnet.

▼B

Ämnen testas normalt endast upp till gränsen för löslighet. För vissa ämnen (t.ex. ämnen som är svårlösliga i vatten, som har ett högt P_{ow}-värde, eller som bildar en stabil dipersion och inte en riktig lösning i vatten) accepteras att man har använt en testkoncentration som är större än lösligheten för att säkerställa att den högsta upplösta/stabila koncentration har nåtts. Det är dock viktigt att denna koncentration inte på annat sätt förstör testmetoden (t.ex. bildar en hinna av ämnet på vattenytan som förhindrar syrsättning av vattnet, etc.).

Ultraljud, organiska lösningsmedel, emulgeringsmedel eller dispergeringsmedel kan användas för att framställa stamlösningar av ämnen som är svårlösliga i vatten och för att dispergera sådan ämnen i testmediet. Om tillsatsämnen används ska alla testkoncentrationer innehålla samma mängd av tillsatsämnet och en extra kontrollgrupp ska användas som utsätts för samma koncentration av tillsatsämnet som den som används i testserien. Sådana tillsatsämnen används i lägsta möjliga koncentration och får aldrig vara större än 100 mg per liter i testmediet.

Testet utförs utan justering av pH-värdet. Om det finns tecken på en markant förändring av pH-värdet rekommenderas att testet upprepas med pH-justering och att dessa resultat rapporteras. I detta fall ska pH-värdet i stamlösningen justeras efter pH-värdet i utspädningsvattnet, om det inte finns särskilda skäl som talar mot detta. HC1 och NaOH är förstahandsvalen för justering av pH-värdet. Denna pH-justering ska göras på ett sådant sätt att testämnets koncentration i stamlösningen inte ändras i någon signifikant grad. Om justeringen medför någon kemisk reaktion eller fysisk utfällning av testämnet ska detta rapporteras.

1.6.1.2 *Vatten till förvaring och utspädning*

Dricksvatten (som inte är förorenat av skadliga koncentrationer av klor, tungmetaller eller andra ämnen), råvatten av god kvalitet eller rekonstituerat vatten (se tillägg 1) kan användas. Vatten med en total hårdhet på mellan 10 och 250 mg per liter (som $CaCO_3$) och med ett pH-värde av 6,0–8,5 är att föredra.

1.6.2 **Apparatur**

All apparatur ska vara tillverkad av kemiskt inert material:

— Automatiskt utspädningssystem (till genomströmningstestet).

— Syremätare.

— Utrustning för bestämning av vattnets hårdhet.

— Lämplig apparatur för temperaturkontroll.

— pH-mätare.

1.6.3 **Testfisk**

Fiskarna ska vara friska och utan synliga missbildningar.

▼B

De arter som ska användas bör väljas på grundval av praktiska kriterier, t.ex. att de är lätt tillgängliga under hela året, enkla att hålla, lämpliga för testet, har en relativ känslighet, samt på grundval av ekonomiska, biologiska och ekologiska faktorer av betydelse. Nödvändigheten att kunna jämföra de data som erhålls och redan genomförd internationell harmonisering (hänvisning 1) bör också beaktas vid val av fiskart.

I tillägg 2 förtecknas de fiskarter som rekommenderas för detta test. Sebrafisk och regnbåge är att föredra.

1.6.3.1 *Förvaring*

Testfisk ska helst komma från ett enda bestånd och vara av ungefär samma längd och ålder. Fisken ska förvaras i minst 12 dagar under följande betingelser:

Belastning:

Anpassad efter systemet (cirkulation eller genomströmning) och fiskarterna.

Vatten:

Se punkt 1.6.1.2.

Ljus:

12–16 timmars ljus per dag.

Koncentration av upplöst syre:

Minst 80 % av luftmättnadsvärdet.

Utfodring:

Dagligen eller tre gånger per vecka, sista gången 24 timmar innan testet inleds.

1.6.3.2 *Dödlighet*

Efter 48 timmars acklimatisering registreras dödligheten och följande kriterier tillämpas:

— Högre än 10 % av populationen på 7 dagar:

hela partiet kasseras.

— Mellan 5 och 10 % av populationen:

observationsperioden förlängs med ytterligare 7 dagar.

Om inga fler dödsfall inträffar kan partiet accepteras, i annat fall kasseras det.

— Lägre än 5 % av populationen:

partiet kan accepteras.

1.6.4 **Tillvänjning**

All fisk ska i minst 7 dagar före testet exponeras för vatten av den kvalitet och temperatur som ska användas i testet.

▼B

1.6.5 **Testförfarande**

Före det slutliga testet kan ett inledande test göras för att fastställa vilka koncentrationer som ska användas i huvudtestet.

Förutom testserien inbegrips en kontrollgrupp som inte tillförs testämnet och, i vissa fall, en kontrollgrupp som tillförs tillsatsämnet.

Beroende på testämnets fysiska och kemiska egenskaper ska ett statiskt test, ett semi-statiskt test eller ett genomströmningstest väljas så att kvalitetskriteriet uppfylls.

Fisken exponeras för testämnet enligt följande:

— Varaktighet: 96 timmar.

— Antal djur: Minst 7 per koncentration.

— Kar: Av passande storlek i förhållande till den rekommenderade belastningen.

— Belastning: För statisk och semistatiska test rekommenderas 1,0 g per liter som maximal belastning. För genomströmningssystem kan större belastning accepteras.

— Testkoncentrationer: Minst 5 koncentrationer med ett konstant inbördes förhållande av högst 2,2 som så långt det för täcker intervallet 0–100 % dödlighet.

— Vatten: Se 1.6.1.2.

— Ljus: 12–16 timmar ljus per dag.

— Temperatur: Lämplig för arten (tillägg 2) men inom ±1 ^{o}C i ett enskilt test.

— Koncentration av upplöst syre: Inte mindre än 60 % av luftmättnadsvärdet vid den valda temperaturen.

— Utfodring: Ingen.

Fisken besiktas efter de första 2–4 timmarna och minst var 24:e timme. Fisk anses vara död om beröring av stjärtfenan inte framkallar någon reaktion och inga andningsrörelser kan iakttas. Död fisk avlägsnas när den upptäcks och dödsfall registreras. Register förs över synliga abnormiteter (t.ex. förlust av jämvikten, ändrat simbeteende, andningsfunktion, pigmentering osv.).

Mätningar av pH, upplöst syre och temperatur ska göras dagligen.

Gränstest

Genom användning av förfarandena som beskrivs i denna testmetod kan ett gränstest utföras med 100 mg per liter för att konstatera om LC_{50} är större än denna koncentration.

Om ämnet är av sådan art att man inte kan erhålla en koncentration av 100 ml per liter i testvattnet utförs gränstestet vid ämnets mättnadskoncentration (eller den högsta koncentrationen vid vilken det bildas en stabil disper-sion) i det använda mediet (se även 1.6.1.1).

▼B

Gränstestet utförs med 7–10 fiskar och en eller två kontrollgrupper av samma storlek. (Enligt binomialteorin är det vid användning av 10 fiskar 99,9 % säkerhet för att LC_{50} är större än den använda koncentrationen, om dödligheten är noll. Med 7, 8 eller 9 fiskar ger en dödlighet av noll 99 % säkerhet för att LC_{50} är större än den använda koncentrationen.)

Om dödsfall sker måste en fullständig undersökning utföras. Eventuella subletala verkningar registreras.

2. **DATA OCH UTVÄRDERING**

För var och en av de tidsperiod då observationer företas (efter 24, 48, 72 och 96 timmar) avbildas den procentuella dödligheten mot koncentrationen på logaritmisk sannolikhetspapper.

När så är möjligt och för varje observationstid ska LC_{50} och dess konfidensgränser ($p = 0,05$) uppskattas genom standardförfaranden. Dessa värden ska avrundas till en (eller högst två) signifikanta siffror (exempel på avrundning till två siffror: 170 för 173,5, 0,13 för 0,127, 1,2 för 1,21).

I de fall där koncentrations-procentresponskurvans lutning är för brant för att medge en beräkning av LC_{50} räcker det med en grafisk uppskattning av detta värde.

Om två på varandra följande koncentrationer med ett förhållande på 2,2 endast ger 0 och 100 % dödlighet, räcker dessa två värden för att ange inom vilket område LC_{50} ligger.

Om det framgår att det inte går att hålla testämnet stabilt eller homogent ska detta rapporteras och försiktighet ska iakttas vid tolkningen av resultaten.

3. **RAPPORTERING**

Testrapporten ska om möjligt innehålla:

— Uppgifter om testfisken (vetenskapligt namn, stam, leverantör, eventuell förbehandling, storlek och antal som använts for varje koncentration).

— Källan till utspädningsvattnet och viktiga kemiska egenskaper (Ph, hårdhet, temperatur).

— För ämnen med låg vattenlöslighet anges metod att framställa stam- och testlösning.

— Koncentrationen av eventuella tillsatsämnen.

— En lista över de koncentrationer som använts och alla tillgängliga uppgifter om testämnets stabilitet vid kon centrationerna i testlösningen.

— Om kemiska analyser görs ska metoder och resultat rapporteras.

— Resultat från gränstest om sådant utförts.

— Skälen till valet av och detaljer om använt testförfarande (t.ex. statisk, semi-statisk, doseringstakt, genomströmningstakt, eventuell syrsättning, antal fiskar osv.).

▼B

— Beskrivning av testutrustningen.

— Ljusbetingelser.

— Testlösningens koncentration av upplöst syre, pH-värden och temperatur var 24:e timme.

— Bevis på att kvalitetskriterierna har uppfyllts.

— Kumulativ dödlighet för varje koncentration och kontrollprov (eller kontroll med tillsatsämne om sådant behövs) vid de rekommenderade observationstiderna.

— Grafisk framställning av denna responskurva över koncentration/procent i slutet av testet.

— Om möjligt, LC_{50}-värden för varje rekommenderad observationstid (med 95 % konfidensgränser).

— Statistiska förfaranden som använts vid bestämning av LC_{50}-värdena.

— Om referensämne har använts ska erhållna resultat anges.

— Högsta testade koncentration som inte medför dödsfall inom testperioden.

— Lägsta testade koncentrationen som medför 100 % dödlighet inom testperioden.

4. **HÄNVISNINGAR**

1. OECD, Paris, 1981, Test Guideline 203, rådets beslut K(81) 30 slutligt och uppdaterat.

2. AFNOR – Determination of the acute toxicity of a substance to *Brachydanio rerio* – Static and Flow Through methods – NFT 90-303 juni 1985.

3. AFNOR – Determination of the acute toxicity of a substance to *Salmo gairdneri* – Static and Flow Through methods – NFT 90-305 juni 1985.

4. ISO 7346/1,/*2* och/3 – Water Quality – Determination of the acute lethal toxicity of a substance to a fresh water fish *(Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan – *Teleostei, Cyprinidae).* Del 1: Static method. Del 2: Semi-static method. Del 3: Flow-through method.

5. Eidgenössiches Departament des Innern, Schweiz: Richtlinien fur Probenahme und Normung von Wasseruntersuchungsmetoden – Del II 1974.

6. DIN Testverfahren mit Wasserorganismen, 38 412 (Ll) och L (15).

7. JIS K 0102, Acute toxicity test for fish.

8. NEN 6506 – Water – Bepailing van de akute toxiciteit met behulp van *Poecilia reticulata,* 1980.

9. Environmental Protection Agency, Methods for the acute toxicity tests with fish, macroinvertebrates and amphibians, The committee on Methods for Toxicity 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, del IV, 16 mars 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. Verfahrensvorschlag des Umweltsbundesamt zum akuten Fisch-Test. Rudolph, P. och Boje, R. Okotoxikologie, Grundlagen fur die okotoxikologische Bewertung von Umweltchemikalien nach dem Chemikalienge-setz, ecomed 1986.

15. Litchfield, J. T. and Wilcoxon, E, A simplified method for evaluating dose effects experiments, J. Pharm, Exp. Therap., vol. 96, 1949, s. 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. II Bioassay methods for acute toxicity. Water Res. 1969, vol. 3, s. 793–821.

18. Sprague, J. B. Measurement of pollutant toxicity to fish. II Utilising and applying bioassay results. Water Res. 1970, vol. 4, s. 3–32.

19. Stephan, C. E. Methods for calculating an LC50. In Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (edited by F. I. Mayer och J. L. Hamelink). American Society for Testing and Materials, ASTM STP 634, 1977, s. 65–84.

20. Stephan, C. E., Busch, K. A., Smith, R., Burke, J. och Andrews, R. W. A computer program for calculating an LC50. US EPA.

▼B

Tillägg 1

Rekonstituterat vatten

Exempel på lämpligt utspädningsvatten

Alla kemikalier ska vara av analytisk renhetsgrad.

Vattnet ska vara destillerat vatten av god kvalitet eller avjoniserat vatten med en ledningsförmåga på mindre än $5 \mu Scm^{-1}$.

Apparatur för destillering av vatten får inte innehålla några delar gjorda av koppar.

Stamlösningar

$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (kalciumklorid dihydrat) 11,76 g
Upplöses i vatten så att 1 liter erhålls.

$MgSO_4.7H_2O$ (magnesiumsulfat heptahydrat): 4,93 g
Upplöses i vatten så att 1 liter erhålls.

$NaHCO_3$ (natriumvätekarbonat): 2,59 g
Upplöses i vatten så att 1 liter erhålls.

KCl (kaliumklond): 0,23 g
Upplöses i vatten så att 1 liter erhålls.

Rekonstituerat utspädningsvatten

Blanda 25 ml av de fyra stamlösningarna med vatten så att 1 liter erhålls.

Syrsätt tills koncentrationen av upplöst syre är lika med luftmättnadsvärdet.

pH ska vara 7,8 ± 0,2.

Justera vid behov pH-värdet med NaOH (natriumhydroxid) eller HCl (saltsyra).

Det således framställda utspädningsvattnet sätts åt sidan i 12 timmar och ska inte syrsättas ytterligare.

Summan av Ca- och Mg-jonerna i denna lösning är 2,5 mmol per liter. Förhållandet mellan Ca- och Mg-jonerna är 4:1 och mellan Na- och K-jonerna 10:1. Den totala alkaliniteten hos denna lösning är 0,8 mmol per liter.

Avvikelser vid framställningen av utspädningsvattnet får inte ändra vattnets sammansättning eller egenskaper.

▼B

Tillägg 2

Fiskarter som rekommenderas till test

Rekommenderade arter	Rekommenderad temperaturintervall (°C)	Rekommenderad total längd på testdjur (cm)
Bracbydanio rerio (Teleostei, Cyprinidae) (Hamilton-Buchanan) Sebrafisk	20–24	3,0 ± 0,5
Pimephales promelas (Teleostei, Cyprinidae) (Rafinesque) Fathead minnow	20–24	5,0 ± 2,0
Cypnnus carpio (Teleostei, Cyprinidae) (Linné 1758) Karp	20–24	6,0 ± 2,0
Oryzias latipes (Teleostei, Poeciliidae) Cyprinodontidae (Tomminck och Schlegel 1850) Red killifish	20–24	3,0 ± 1,0
Poecilia reticulata (Teleostei, Poeciliidae) (Peters 1859) Guppy	20–24	3,0 ± 1,0
Lepomis macrochirus (Teleostei, Centrarchidae) (Rafinesque Linneaus 1758) Bluegill	20–24	5,0 ± 2,0
Onchorhynchus mykiss (Teleostei, Salmonidae) (Walbaum 1988) Regnbågsforell	12–17	6,0 ± 2,0
Leuciscus idus (Teleostei, Cyprinidae) (Linné 1758) Guldfisk	20–24	6,0 ± 2,0

Odlingsbetingelser

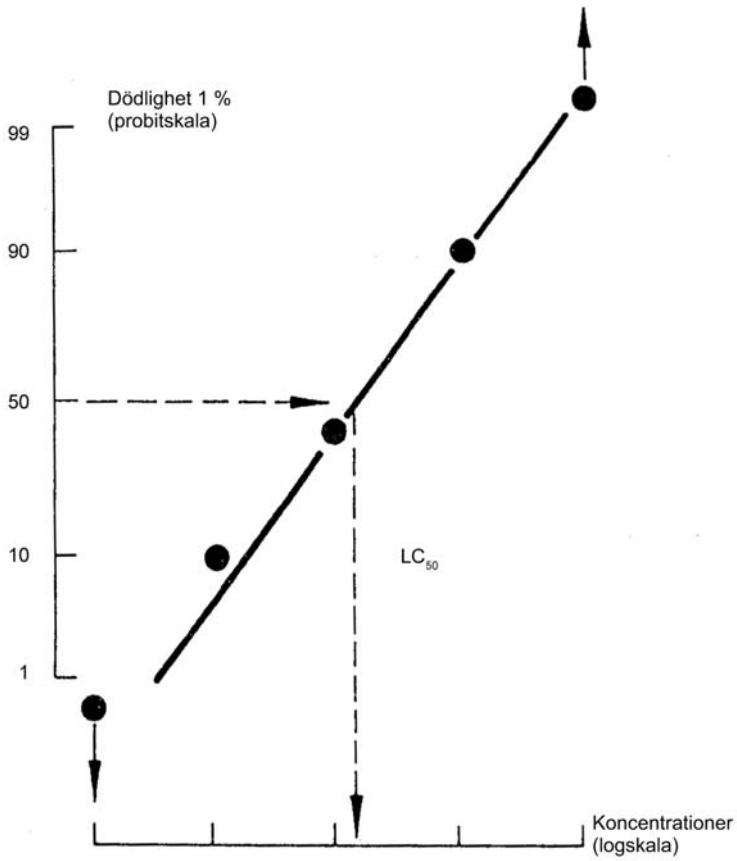
Ovan angivna fiskar är lätta att odla och/eller är lätt tillgängliga året runt. De kan förädlas och odlas i fiskdammar eller i laboratorier under sjukdoms- och parasitkontrollerade betingelser så att testdjuren är friska och av känd härstamning. Dessa fiskar finns i många delar av världen.

▼B

Tillägg 3

Exempel på kurva över koncentration mot dödlighet

Exempel på bestämning av LC_{50} på log-probit-papper



▼B

C.2 TEST AV AKUT IMMOBILISERING AV *DAPHNIA*-ARTER

1. METOD

Denna testmetod för akut immobilisering motsvarar OECD TG 202 (2004).

1.1 INLEDNING

Denna metod beskriver ett akut toxicitetstest för att bedöma effekten av kemikalier på hinnkräftor *(Daphnia)*. Såvitt möjligt har befintliga testmetoder använts (1)(2)(3).

1.2 DEFINITIONER

För denna metods ändamål gäller följande definitioner:

EC_{50}: Den koncentration som beräknas immobilisera 50 % av hinnkräftorna inom en given exponeringstid. Om någon annan definition används måste denna rapporteras tillsammans med en hänvisning.

Immobilisering: De djur som inte längre kan simma inom 15 sekunder efter varsam skakning av testkärlet anses vara immobiliserade (även om de fortfarande kan röra på antennerna).

1.3 PRINCIP FÖR TESTMETODEN

Unga havskräftor, yngre än 24 timmar då testet inleds, exponeras för testämnet i en serie koncentrationer under en period av 48 timmar. Immobilisering registreras vid 24 timmar och 48 timmar och jämförs med kontrollvärden. Resultaten analyseras för beräkning av EC_{50} vid 48 timmar (se avsnitt 1.2 för definitioner). Bestämning av EC_{50} vid 24 timmar är valfri.

1.4 INFORMATION OM TESTÄMNET

Testämnets vattenlöslighet och ångtryck ska vara kända och en tillförlitlig analysmetod ska finnas tillgänglig för kvantifiering av ämnet i testlösningen, med rapporterad återvinningseffektivitet samt analysgräns. Användbar information inbegriper strukturformel, ämnets renhet, stabiliteten i vatten och i ljus, P_{ow} och resultat från ett test för biologisk nedbrytbarhet (se metod C.4).

Anmärkning: Vägledning för testämnen med fysikalkemiska egenskaper som gör dem svåra att testa ges i (4).

1.5 REFERENSÄMNEN

Ett referensämne kan testas med avseende på EC_{50} som ett sätt att garantera att försöksbetingelserna är tillförlitliga. Giftämnen som används vid internationell ringtestning (1)(5) rekommenderas för detta ändamål ([1]). Försök med ett referensämne ska helst göras varje månad och minst två gånger per år.

([1]) Resultaten av dessa laboratorieförsök och en teknisk rättelse till ISO 6341 ger ett EC_{50} – 24 timmar för kaliumdikromat ($K_2Cr_2O_7$) i intervallet 0,6 mg/l till 1,7 mg/l.

▼B

1.6 KVALITETSKRITERIER

För att ett försök ska vara giltigt gäller följande kriterier för prestanda:

— I kontrollerna, inbegripet den kontroll som innehåller solubiliseringsagenset, får inte mer än 10 % av hinnkräftorna immobiliseras.

— Koncentrationen av löst syre i slutet av försöket ska vara > 3 mg/l i kontroll- och testkärl.

Anmärkning: För det första kriteriet ska inte mer än 10 % av kontrollhinnkräftorna uppvisa immobilisering eller andra tecken på sjukdom eller stress, t.ex. missfärgning eller ovanligt beteende såsom infångning vid vattenytan.

1.7 BESKRIVNING AV TESTMETODEN

1.7.1 **Utrustning**

Försökskärl och annan apparatur som kommer i kontakt med testlösningarna bör vara tillverkade helt i glas eller annat kemiskt inert material. I regel används glasprovrör eller glasbägare. Dessa bör rengöras före varje rutinmässigt laboratorieförfarande. Försökskärlen ska vara löst täckta för att minska vattenförlusten på grund av avdunstning och för att förhindra att damm kommer ner i lösningarna. Flyktiga ämnen ska testas i helt fyllda, slutna kärl som är tillräckligt stora för att förhindra att syret blir begränsande eller att det blir syrebrist (se avsnitt 1.6 och första stycket i avsnitt 1.8.3).

Dessutom behövs åtminstone en del av följande utrustning: syrgasmätare (med mikroelektrod eller annan lämplig anordning för att mäta löst syre i lågvolymsprover), pH-meter, adekvat anordning för temperaturkontroll, utrustning för bestämning av totalt organiskt kol (TOC), utrustning för bestämning av kemisk syreförbrukning (COD), utrustning för bestämning av vattnets hårdhetsgrad.

1.7.2 **Försöksorganism**

Daphnia magna Straus är den föredragna testarten, även om andra lämpliga arter av hinnkräfta kan användas i detta test (t.ex. *Daphnia pulex)*. Vid testets början måste djuren vara yngre än 24 timmar och för att minska variabiliteten är en stark rekommendation att de inte tillhör den första satsen avkomma. De ska komma från en frisk stam (dvs. inte visa tecken på stress, t.ex. hög dödlighet, förekomst av hanar och ephippia, fördröjd produktion av första satsen avkomma, missfärgade djur osv.). Alla organismer som används för ett visst försök ska ha sitt ursprung i odlingar som etablerats från samma stam av hinnkräftor. Stamdjuren måste hållas i samma odlingsbetingelser (ljus, temperatur, medium) som används vid testet. Om annat än normalt odlingsmedium för hinnkräftor används vid testet är det tillrådligt med en acklimatiseringsperiod före testet. Under denna period ska Dapnia-avkomman hållas i utspädningsvatten vid testtemperaturen under minst 48 timmar innan testet inleds.

▼B

1.7.3 **Förvarings- och utspädningsvatten**

Naturligt vatten (yt- eller grundvatten), rekonstituerat vatten eller avklorerat kranvatten är godtagbart som förvarings- och utspädningsvatten om hinnkräftorna överlever i det under odling, acklimatisering och testning utan att uppvisa tecken på stress. Vatten som uppfyller de kemiska egenskaper som listas i bilaga 1 är lämpliga som testvatten. Vattnet ska hålla konstant kvalitet under testperioden. Rekonstituerat vatten kan framställas genom tillsats av specifika mängder reagens av vedertagen analysrenhetsgrad till avjonat eller destillerat vatten. Exempel på rekonstituerat vatten ges i (1) (6) och i bilaga 2. Observera att medier som innehåller kända kelateringsmedel, t.ex. M4- och M7-medium i bilaga 2, ska undvikas för testämnen som innehåller metaller. pH ska ligga i området 6 till 9. En hårdhetsgrad på mellan 140 och 250 mg/l (i form av $CaCO_3$) rekommenderas för *Daphnia Magna,* medan även lägre hårdhetsgrader kan vara lämpliga för andra *Daphnia*-arter. Utspädningsvattnet kan luftas före testet så att koncentrationen av löst syre når mättnad.

Om naturligt vatten används ska kvalitetsparametrarna mätas minst två gånger per år eller närhelst man kan misstänka att dessa egenskaper kan ha ändrats väsentligt (se stycket ovan och bilaga 1). Mätningar av tungmetaller (t.ex. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni) ska också göras. Om avklorerat kranvatten används är en daglig kloranalys önskvärd. Om utspädningsvattnet kommer från en yt- eller grundvattenkälla ska konduktivitet samt totalt organiskt kol (TOC) eller kemisk syreförbrukning (COD) mätas.

1.7.4 **Testlösningar**

Testlösningar av de valda koncentrationerna bereds i regel genom utspädning av en stamlösning. Stamlösningarna bör helst beredas genom upplösning av testämnet i utspädningsvattnet. Så långt det är möjligt bör bruk av lösningsmedel, emulgeringsmedel eller dispergeringsmedel undvikas. Sådana föreningar kan dock krävas i vissa fall för att få en stamlösning av lämplig koncentration. Vägledning när det gäller lämpliga lösningsmedel, emulgeringsmedel och dispergeringsmedel ges i (4). Testämnets halt i testlösningarna bör under inga omständigheter överskrida lösligheten i utspädningsvattnet.

Testet ska göras utan pH-justering. Om pH inte ligger kvar i området 6–9 görs ett andra test, med justering av stamlösningens pH till utspädningsvattnets före tillsats av testämne. pH-justeringen ska göras på ett sådant sätt att stamlösningens koncentration inte förändras väsentligt och så att ingen kemisk reaktion eller utfällning av testämnet orsakas. HC1 och NaOH är föredragna.

▼B

1.8 FÖRFARANDE

1.8.1 **Exponeringsförhållanden**

1.8.1.1 *Testgrupper och kontroller*

Testkärlen fylls med lämpliga volymer utspädningsvatten och lösningar av testämne. Kvoten luftvolym/vattenvolym i kärlet ska vara identisk för test- och kontrollgruppen. Hinnkräftorna placeras sedan i testkärlen. Minst 20 djur, helst indelade i fyra grupper om fem vardera, ska användas för varje testkoncentration och för kontrollerna. Minst 2 ml testlösning ska tillhandahållas för varje djur (dvs. en volym på l0 ml för fem hinnkräftor per testkärl). Testet kan utföras med halvstatisk förnyelse eller med genomflödessystem där koncentrationen av testämne inte är stabil.

En kontrollserie med utspädningsvatten och också, om detta är relevant, en kontrollserie som innehåller solubiliseringsagenset måste köras utöver behandlingsserierna.

1.8.1.2 *Testkoncentrationer*

Ett test för att söka intervall kan genomföras för att bestämma koncentrationsområdet för det egentliga testet om ingen information om testämnets toxicitet finns att tillgå. För detta ändamål exponeras hinnkräftorna för en serie koncentrationer av testämnet som ligger långt ifrån varandra. Fem hinnkräftor ska utsättas för varje testkoncentration i 48 timmar eller mindre, och inga replikat krävs. Exponeringstiden kan förkortas (t.ex. 24 timmar eller mindre) om data lämpliga för intervalltestets ändamål kan erhållas på kortare tid.

Minst fem testkoncentrationer ska användas. Dessa arrangeras i geometriska serier med en separationsfaktor som helst inte överskrider 2,2. Om färre än fem koncentrationer används ska detta motiveras. Den högsta testade koncentrationen ska helst ge l00-procentig immobilisering, och den lägsta koncentrationen som testas ska helst inte ge någon observerbar effekt alls.

1.8.1.3 *Inkuberingsförhållanden*

Temperaturen ska ligga i området 18 °C till 22 °C, och för varje enskilt test ska den vara konstant inom ± 1 °C. En dygnscykel med 16 timmar ljus och 8 timmar mörker rekommenderas. Fullständigt mörker är också godtagbart, särskilt om testämnet är instabilt i ljus.

Testkärlen måste luftas under testet. Testet genomförs utan pH-justering. Hinnkräftorna ska inte utfodras under testet.

1.8.1.4 *Varaktighet*

Testets varaktighet är 48 timmar.

1.8.2 **Observationer**

Varje testkärl ska kontrolleras med avseende på immobiliserade hinnkräftor 24 och 48 timmar efter det att testet har påbörjats (se avsnitt 1.2 för definitioner). Utöver immobilisering ska alla onormala förändringar av beteende och utseende rapporteras.

▼B

1.8.3 **Analyser**

Löst syre och pH mäts i början och i slutet av testet i kontrollen eller i kontrollerna och i den högsta testämneskoncentrationen. Koncentrationen av löst syre i kontrollerna ska överensstämma med giltighetskriteriet (se avsnitt 1.6). pH-värdet ska normalt inte variera med mer än 1,5 enheter i något enskilt test. Temperaturen mäts i regel i kontrollkärlen eller som omgivningstemperatur och ska helst registreras kontinuerligt under testet eller åtminstone i början och i slutet av testet.

Koncentrationen av testämne ska mätas minst vid den högsta och den lägsta testkoncentrationen i början och i slutet av testet (4). Det rekommenderas att resultaten baseras på uppmätta koncentrationer. Om det finns belägg för att koncentrationen av testämnet har hållit sig inom ± 20 % av den nominella eller uppmätta initiala koncentrationen genom hela testet kan resultaten dock baseras på nominella eller uppmätta initialvärden.

1.9 LIMIT-TEST

Genom användning av de förfaranden som beskrivs i denna metod kan ett så kallat limit-test göras upp vid 100 mg/l testämne eller upp till ämnets löslighetsgräns i testmediet (den av dessa koncentration som är lägst) för att visa att EC_{50} är högre än denna koncentration. Limit-testet ska göras med 20 hinnkräftor (helst indelade i fyra grupper om fem), med samma antal i kontrollen eller kontrollerna. Om någon immobilisering sker ska en fullständig studie genomföras. Allt onormalt beteende som observeras ska registreras.

2. **DATA**

Data ska sammanfattas i tabellform som för varje behandlingsgrupp och kontroll visar antalet hinnkräftor som använts och immobilisering vid varje observation. Procentandelen immobiliserade hinnkräftor vid 24 timmar och 48 timmar plottas mot testkoncentrationerna. Data analyseras med lämpliga statistiska metoder (t.ex. probitanalys osv.) för att beräkna kurvornas lutningar och EC_{50} med 95 % konfidensintervall ($p = 0,05$) (7) (8).

Om standardmetoderna för att beräkna EC_{50} inte går att tillämpa på erhållna data ska den högsta koncentration som inte ger någon immobilisering och den lägsta koncentration som ger 100 % immobilisering användas som approximering för EC_{50} (eftersom detta värde betraktas som det geometriska medelvärdet för dessa båda koncentrationer).

3. **RAPPORTERING**

3.1 FÖRSÖKSRAPPORT

Försöksrapporten måste innehålla följande information:

Testämne:

— Fysikaliskt tillstånd och relevanta fysikalkemiska egenskaper.

▼B

— Kemiska identifieringsdata, inbegripet renhet.

Försöksart:

— Källa och art av *Daphnia,* leverantör av källan (om denna är känd) och odlingsbetingelser (inbegripet fodrets källa, typ och mängd samt utfodringsfrekvens).

Försöksförhållanden:

— Beskrivning av försökskärlen: typ av kärl, lösningsvolym, antal hinnkräftor per försökskärl (replikat) per koncentration.

— Beredningsmetoder för stam- och testlösningar, inbegripet användning av lösningsmedel eller dispergeringsmedel, använda koncentrationer.

— Detaljerade uppgifter om utspädningsvattnet: källa och detaljerade uppgifter om vattenkvalitet (pH, hårdhetsgrad, Ca/Mg-kvot, Na/K-kvot, alkalinitet, konduktivitet osv.) samt sammansättning om rekonstituerat vatten används.

— Inkuberingsförhållanden: temperatur, ljusintensitet och periodicitet, löst syre, pH osv.

Resultat:

— Antal och procentandel hinnkräftor som immobiliserats eller visat tecken på negativ inverkan (inbegripet onormalt beteende) i kontrollerna och i varje behandlingsgrupp vid varje observationstidpunkt samt en beskrivning av de effekter som observerats.

— Resultat och datum för tester som utförts med referensämnen, om detta finns att tillgå.

— De nominella testkoncentrationerna och resultaten av alla analyser för bestämning av koncentrationen av testämne i försökskärlen. Även metodens återvinningseffektivitet och analysgräns ska rapporteras.

— Alla fysikalkemiska mätningar av temperatur, pH och löst syre som gjorts under testet.

— EC_{50} vid 48 timmar för immobilisering med konfidensintervall och diagram över den anpassade modell som använts för att beräkna dessa värden, lutningarna för dos-responskurvorna och deras standardfel; statistiska förfaranden som använts för bestämning av EC_{50}; (dessa data för immobiliseringen vid 24 timmar ska också rapporteras om de mäts).

— Förklaring till eventuell avvikelse från testmetoden och uppgift om huruvida avvikelsen påverkade resultaten.

4. **HÄNVISNINGAR**

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/11, Environment Canada, Ottawa, Ontario, Kanada.

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. Pp65–84.

8. Finney D.J. (1978). Statistical Methods in Biological Assay. 3rd ed. London. Griffin, Weycombe, UK.

▼B

Bilaga 1

VISSA KEMISKA EGENSKAPER FÖR ETT GODTAGBART SPÄDNINGSVATTEN

Ämne	Koncentration
Partiklar	< 20 mg/l
Totalt organiskt kol	< 2 mg/l
Icke-joniserat ammonium	< 1 µg/l
Restklor	< 10 µg/l
Total mängd pesticider med organiskt fosfat	< 50 ng/l
Total mängd pesticider med organiskt klor plus polyklorerade bifenyler	< 50 ng/1
Totalt organiskt klor	< 25 ng/1

▼B

Bilaga 2

EXEMPEL PÅ LÄMPLIGT REKONSTITUERAT TESTVATTEN

ISO för testvatten (1)

Stamlösningar (enstaka ämnen)		För framställning av rekonstituerat vatten, sätt följande volymer av stamlösningarna till 1 liter vatten (*)
Ämne	Mängd tillsatt 1 liter vatten (*)	
Kalciumklorid $CaCl_2$, $2H_2O$	11,76 g	25 ml
Magnesiumsulfat $MgSO_4$, $7H_2O$	4,93 g	25 ml
Natriumbikarbonat $NaHCO_3$	2,59 g	25 ml
Kaliumklorid K Cl	0,23 g	25 ml

(*) Vatten av lämplig renhet, t.ex. avjonat, destillerat eller renat med omvänd osmos med en konduktivitet som inte överskrider l0 $\mu S.cm^{-1}$.

Elendt M7- och M4-medium

Acklimatisering till Elendt M4- och M7-medium

Vissa laboratorier för över hinnkräftorna direkt till M4- och M7-medier. En viss framgång har uppnåtts med gradvis acklimatisering, dvs. överflyttning från eget medium till 30 % Elendt, sedan till 60 % Elendt och slutligen till 100 % Elendt. Acklimatiseringsperioderna kan behöva vara upp till en månad långa.

Beredning

Spårelement

Separata stamlösningar (I) av enskilda spårelement bereds först i vatten av lämplig renhet, t.ex. avjoniserat, destillerat eller renat med omvänd osmos. Från dessa olika stamlösningar (I) bereds en andra stamlösning (II) som innehåller alla spårelement (kombinerad lösning), dvs.:

Stamlösning(ar) I (enskilt ämne)	Mängd satt till 1 l vatten (mg/l)	Koncentration (relaterad till medium M4)	För beredning av den kombinerade stamlösningen II tillsätts följande mängd av stamlösning I till 1 l vatten (ml/l)	
			M4	M7
H_3 BO_3	57 190	20 000-faldig	1,0	0,25
$MnCl_2.4H_2O$	7 210	20 000-faldig	1,0	0,25
LiCl	6 120	20 000-faldig	1,0	0,25

▼B

Stamlösning(ar) I (enskilt ämne)	Mängd satt till 1 l vatten (mg/l)	Koncentration (relaterad till medium M4)	För beredning av den kombinerade stamlösningen II tillsätts följande mängd av stamlösning I till 1 l vatten (ml/l)	
			M4	M7
RbCl	1 420	20 000-faldig	1,0	0,25
$SrCl_2.6H_2O$	3 040	20 000-faldig	1,0	0,25
NaBr	320	20 000-faldig	1,0	0,25
$Na_2MoO_4.2H_2O$	1 230	20 000-faldig	1,0	0,25
$CuCl_2.2H_2O$	335	20 000-faldig	1,0	0,25
$ZnCl_2$	260	20 000-faldig	1,0	1,0
$CoCl_2.6H_20$	200	20 000-faldig	1,0	1,0
KI	65	20 000-faldig	1,0	1,0
$Na_2\ SeO_3$	43,8	20 000-faldig	1,0	1,0
$NH_4\ VO_3$	11,5	20 000-faldig	1,0	1,0
Na_2 EDTA.$2H_2O$	5 000	2 000-faldig	—	—
$FeSO_4.7H_2O$	1 991	2 000-faldig	—	—

Både Na_2EDTA- och $FeSO_4$-lösningarna förbereds var för sig, hälls samman och autoklaveras omedelbart.

Detta ger:

21 Fe-EDTA-lösning		1 000-faldig	20,0	5,0

M4- och M7-medier

M4- och M7-medier bereds med stamlösning II, makro-näringsämnen och vitaminer enligt följande:

	Mängd tillsatt vatten (mg/l)	Koncentration (relaterad till medium M4)	Mängd stamlösning II som tillsätts för beredning av medium (ml/l)	
			M4	M7
Stamlösning II (kombinerad med spårelement)		20-faldig	50	50
Stamlösningar för makronäringsämnen (enskilt ämne)				
$CaCl_2\ .\ 2H_20$	293 800	1 000-faldig	1,0	1,0
$MgSO_4\ .\ 7H_2O$	246 600	2 000-faldig	0,5	0,5
KC1	58 000	10 000-faldig	0,1	0,1
$NaHCO_3$	64 800	1 000-faldig	1,0	1,0
$Na_2\ SiO_3\ .\ 9H_2O$	50 000	5 000-faldig	0,2	0,2
$NaNO_3$	2 740	10 000-faldig	0,1	0,1
$KH_2\ PO_4$	1 430	10 000-faldig	0,1	0,1
K_2HPO_4	1 840	10 000-faldig	0,1	0,1

▼B

	Mängd tillsatt vatten (mg/l)	Koncentration (relaterad till medium M4)	Mängd stamlösning II som tillsätts för beredning av medium (ml/l)	
			M4	M7
Kombinerad vitaminstamlösning	—	10 000-faldig	0,1	0,1
Den kombinerade vitaminstamlösningen bereds genom tillsats av de tre vitaminerna till 1 l vatten, såsom visas nedan:				
Tiaminhydroklorid	750	10 000-faldig		
Cyanokobalamin (B_{12})	10	10 000-faldig		
Biotin	7,5	10 000-faldig		

Den kombinerade vitaminstamlösningen lagras fryst i små alikvoter. Vitaminer sätts till medierna strax före användning.

Märk: För att undvika utfällning av salter vid beredning av kompletta medier ska alikvoter av stamlösningar sättas till cirka 500–800 ml avjonat vatten som sedan späds upp till 1 liter.

Märk: Den första publiceringen av M4-mediet finns 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 BESTÄMNING AV TILLVÄXTHÄMNING HOS SÖTVATTENSALGER OCH CYANOBAKTERIER

INLEDNING

1. Den här testmetoden motsvarar OECD:s testriktlinje (TG) 201 (2006, bilaga rättad 2011). Det finns ett behov av att utvidga testmetoden till att omfatta ytterligare arter och att uppdatera den för att uppfylla kraven beträffande farobedömning och klassificering av kemikalier. Revideringen har gjorts på grundval av betydande praktisk erfarenhet, den vetenskapliga utvecklingen när det gäller toxicitetstester på alger, samt en omfattande användning av den tidigare versionen av dokumentet för normerande ändamål.

2. De definitioner som används finns i tillägg 1.

PRINCIP FÖR TESTMETODEN

3. Syftet med testet är att bestämma vilka effekter ett kemiskt ämne har på tillväxten hos sötvattenslevande mikroalger och/eller cyanobakterier. De exponentiellt tillväxande testorganismerna exponeras för testämnet i batchkulturer under en tidsperiod på vanligen 72 timmar. Trots att testperioden är relativt kort kan effekterna på flera generationer bedömas.

4. Systemets respons innebär att tillväxten i en serie algkulturer (testenheter) som exponeras för olika koncentrationer av en testkemikalie minskar. Responsen betraktas som en funktion av exponeringskoncentrationen jämfört med den genomsnittliga tillväxten för icke-exponerade kontrollreplikat. För att testsystemet ska kunna ge full respons på en toxisk testkemikalie (optimal känslighet) får kulturerna tillväxa exponentiellt utan några begränsningar, samt med tillräcklig näringstillgång och i kontinuerligt ljus, under den tid som krävs för att minskningen i specifik tillväxthastighet ska bli mätbar.

5. Tillväxtens och tillväxtminskningens storlek bestäms genom mätningar av algbiomassans förändring över tiden. Algbiomassa definieras som torrvikten alger per volymenhet, t.ex. mg alger/liter testlösning. Torrvikt är dock svårt att mäta, varför man kan använda sig av olika alternativa parametrar. Av dessa används oftast cellantal. Andra alternativa parametrar inbegriper cellvolym, flourescens, optisk täthet etc. En omvandlingsfaktor mellan den uppmätta alternativa parametern och biomassan bör vara känd.

6. Endpoint i testet är tillväxthämning, där tillväxt uttrycks som den logaritmiska ökningen av biomassan (den genomsnittliga specifika tillväxthastigheten) under exponeringsperioden. Från de genomsnittliga specifika tillväxthastigheter som uppmätts i en serie testlösningar fastställer man den koncentration av testkemikalien som ger upphov till en bestämd minskning av tillväxthastigheten, x % (t.ex. 50 %). Värdet uttrycks som E_rC_x (t.ex. E_rC_{50}).

7. I den här testmetoden används även producerad mängd biomassa som responsvariabel, något som kan vara nödvändigt för att uppfylla gällande krav i vissa länder. Denna variabel definieras som biomassans storlek vid exponeringstidens slut minus biomassans storlek vid exponeringstidens början. Med utgångspunkt i den mängd biomassa som producerats i en serie testlösningar beräknar man den koncentration av testämnet som ger upphov till en bestämd minskning av mängden producerad biomassa, x % (t.ex. 50 %). Detta värde uttrycks som E_yC_x (t.ex. E_yC_{50}).

8. Den lägsta koncentrationen med observerad effekt (LOEC) och den högsta koncentrationen utan observerad effekt (NOEC) kan också bestämmas statistiskt.

▼M6

INFORMATION OM TESTKEMIKALIEN

9. Information om testkemikalien som kan vara av värde när man fastställer testbetingelserna är bland annat strukturformel, renhetsgrad, ljusbeständighet, stabilitet under testbetingelserna, ljusabsorberande förmåga, pKa samt resultat från undersökningar av kemikaliens omvandling, inklusive bionedbrytbarhet i vatten.

10. Testkemikaliens vattenlöslighet, fördelningskoefficient oktanol/vatten (P_{ow}) och ångtryck ska vara kända, och det ska finnas en validerad metod för kvantitativ bestämning av kemikalien i testlösningarna. Metodens utbyte och detektionsgräns ska vara kända.

TESTETS GILTIGHET

11. För att testresultaten ska vara giltiga måste följande effektivitetskriterier vara uppfyllda:

— Biomassan i kontrollkulturerna ska ha ökat exponentiellt med minst en faktor 16 inom testperioden (72 timmar). Detta motsvarar en specifik tillväxthastighet på 0,92/dygn^{-1}. De mest använda arterna har vanligen en betydligt högre tillväxthastighet (se tillägg 2). Kravet kan dock inte alltid uppfyllas när man använder sig av arter som växer långsammare än de som anges i tillägg 2. Testperioden ska då förlängas så att man erhåller en minst 16-faldig tillväxt i kontrollkulturerna, och tillväxten måste vara exponentiell under hela testperioden. Testperioden kan även förkortas ända ner till 48 timmar om detta krävs för att uppnå obegränsad exponentiell tillväxt under testet. Ett villkor för detta är dock att tillväxtfaktorn är minst 16-faldig.

— Variationskoefficientens medelvärde för sektionsvisa specifika tillväxthastigheter (dagarna 0–1, 1–2 och 2–3 för 72-timmarstester) i kontrollkulturerna (se tillägg 1 under ”variationskoefficient”) får inte överskrida 35 %. I punkt 49 beskrivs hur man beräknar den sektionsvisa specifika tillväxthastigheten. Detta kriterium tillämpas på medelvärdet för de variationskoefficienter som beräknats för kontrollreplikaten.

— I tester med *Pseudokirchneriella subcapitata* och *Desmodesmus subspicatus* får variationskoefficienten för genomsnittlig specifik tillväxthastighet i kontrollreplikaten inte överskrida 7 % under hela testperioden. För arter som inte används så ofta i testsammanhang får värdet inte överstiga 10 %.

REFERENSKEMIKALIE

12. Referenskemikalie(r), t.ex. 3,5-diklorfenol, som används i det internationella ringtestet (1), kan testas för att kontrollera testförfarandet. För grönalger kan även kaliumdikromat användas som referenskemikalie. Referenskemikalier bör testas minst två gånger per år.

TESTMETODENS TILLÄMPBARHET

13. Denna testmetod är lättast att tillämpa på vattenlösliga kemikalier som under testförhållandena sannolikt kommer att stanna kvar i vattnet. Om man vill testa kemikalier som är flyktiga, starkt adsorberande, färgade, svårlösliga i vatten eller som kan påverka tillgången på näringsämnen och mineraler i

▼M6

testmediet kan det krävas vissa modifieringar av den beskrivna metoden (t.ex. slutna system, anpassningar av testkärlen). Några exempel på lämpliga modifieringar ges i (2) (3) och (4).

BESKRIVNING AV TESTMETODEN

Utrustning

14. Testkärl och annan utrustning som kommer i kontakt med testlösningarna ska vara tillverkade uteslutande av glas eller något annat kemiskt inert material. Utrustningen rengörs noggrant, så att inga organiska eller oorganiska föroreningar påverkar algernas tillväxt eller testlösningarnas sammansättning.

15. Testkärlen är normalt glaskolvar vars storlek tillåter mätningar på en tillräckligt stor volym av testkulturen under testet och ett tillräckligt högt utbyte av CO_2 med den omgivande luften (se punkt 30). Observera att vätskevolymen måste vara tillräckligt stor för analytiska bestämningar (se punkt 37).

16. Dessutom behövs åtminstone en del av följande utrustning:

— Odlingsutrustning. Man bör använda ett odlingsskåp eller en odlingskammare där inkuberingstemperaturen kan regleras med en noggrannhet av ± 2 °C.

— Instrument för ljusmätning. Observera att mätvärdena för ljusintensitet kan påverkas av mätmetoden, särskilt typen av ljussensor (mottagare). Mätningarna bör helst göras med en sfärisk (4 π) sensor (som mäter både direkt och reflekterat ljus från alla vinklar ovanför och under mätplanet), eller en 2 π -sensor (som mäter ljus från alla vinklar ovanför mätplanet).

— Utrustning för att bestämma algbiomassa. Cellantal, som är den oftast använda alternativa parametern för algbiomassa, kan bestämmas med hjälp av elektronisk partikelräknare, mikroskop utrustat med räknekammare eller flödescytometer. Andra alternativ till biomassa kan mätas med hjälp av flödescytometer, fluorimeter, spektrofotometer eller kolorimeter. Man bör helst beräkna omvandlingsfaktorn mellan cellantal och torrvikt. När koncentrationen av biomassa är låg kan det vid spektrofotometriska mätningar vara nödvändigt att använda sig av kyvetter med en strålgång på minst 4 cm för att få fram användbara mätvärden.

Testorganismer

17. Ett stort antal arter icke-fastsittande mikroalger och cyanobakterier kan användas. De stammar som förtecknas i tillägg 2 har visat sig vara lämpliga för denna testmetod.

18. Om man använder sig av andra arter ska stammen och/eller ursprunget anges. Bekräfta att de alger som används kan tillväxa exponentiellt under hela testperioden under rådande testförhållanden.

Odlingsmedium

19. Det rekommenderas att man använder antingen OECD-mediet eller AAP-mediet som odlingsmedium. Sammansättningen av dessa medier framgår av tillägg 3. Observera att de två medierna har olika utgångsvärde för pH och olika buffringsförmåga (motverkar pH-ökningar). Testresultaten kan därför variera beroende på vilket medium som används, särskilt när man testar joniserande kemikalier.

▼M6

20. Det kan ibland vara nödvändigt att modifiera odlingsmediet, t.ex. då man testar metaller eller kelatbildare, eller då testerna görs vid skilda pH-värden. Användning av modifierade medier ska beskrivas i detalj och motiveras (3) (4).

Biomassans startkoncentration

21. Biomassans startkoncentration ska vara densamma för alla testkulturer. Den ska också vara tillräckligt låg för att möjliggöra exponentiell tillväxt under hela inkuberingen utan att några näringsämnen tar slut. Startvärdet får inte överskrida 0,5 mg/l, räknat på torrvikt. Följande cellkoncentrationer rekommenderas:

Pseudokirchneriella subcapitata	$5 \times 10^3 - 10^4$ celler/ml
Desmodesmus subspicatus	$2–5 \times 10^3$ 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

Testkemikaliens koncentrationer

22. Det koncentrationsområde där det är troligt att testkemikalien ger effekt kan bestämmas på grundval av resultat från preliminära tester (range-finding tests). För det slutliga testet bör minst fem koncentrationer väljas i en geometrisk serie vars faktor inte överstiger 3,2. För testkemikalier med plan dos-responskurva kan det vara befogat att använda en högre faktor. Koncentrationsserien bör helst omfatta ett intervall som minskar algernas tillväxthastighet med 5–75 %.

Replikat och kontroller

23. För varje koncentration av testkemikalien ska det finnas tre replikat. Om NOEC inte behöver bestämmas kan man ändra testupplägget så att antalet koncentrationer ökas medan antalet replikat per koncentration minskas. Minst tre kontrollreplikat ska användas, och helst bör de vara dubbelt så många som antalet replikat för varje koncentration av testkemikalien.

24. En extra serie testlösningar kan beredas för analytisk bestämning av testkemikaliens koncentrationer (se punkterna 36 och 38).

25. Om ett lösningsmedel används för att lösa upp testkemikalien måste man ta med ytterligare kontroller där koncentrationen av lösningsmedel är densamma som i testkulturerna.

Beredning av ympkultur

26. En ympkultur bereds i testmedium 2–4 dagar innan testet påbörjas. Syftet med detta är att algerna ska kunna anpassa sig till testförhållandena och befinna sig i en exponentiell tillväxtfas när de senare ympas i testlösningarna. Algbiomassan bör regleras så att ympkulturen fortsätter att tillväxa exponentiellt till dess att testet inleds. Ympkulturen inkuberas under samma

▼M6

förhållanden som testkulturerna. En mätning görs av ökningen av ympkulturens biomassa, så att man kan förvissa sig om att tillväxten befinner sig inom det normala intervallet för den använda stammen under rådande odlingsbetingelser. I tillägg 4 ges ett exempel på en metod för algodling. Det kan krävas ett andra förökningssteg för ympkulturen för att undvika synkron celldelning under testet.

Beredning av testlösningar

27. Alla testlösningar ska innehålla samma koncentration av odlingsmediet och samma startkoncentration av algbiomassan. Testlösningar av de valda koncentrationerna bereds vanligen genom att man blandar en stamlösning av testkemikalien med odlingsmedium och ympkultur. Stamlösningar brukar beredas genom upplösning av kemikalien i testmediet.

28. Lösningsmedel som aceton, tert-butylalkohol och dimetylformamid kan användas som bärare när man tillsätter kemikalier med låg vattenlöslighet till testmediet (2) (3). Lösningsmedlets koncentration får inte överstiga 100 µl/l, och det tillsatta lösningsmedlet ska vara av samma koncentration för alla kulturer (inklusive kontroller) i testserien.

Inkubering

29. Testkärlen försluts med luftgenomsläppliga proppar. Kärlen skakas och placeras sedan i odlingsutrustningen. Under testet måste man hålla algerna i suspension och underlätta ett tillräckligt stort utbyte av CO_2. Därför ska innehållet hela tiden skakas eller röras om. Temperaturen i kulturerna ska vara 21–24 °C, och den ska kunna regleras med en noggrannhet av ± 2 °C. När det gäller arter som inte förtecknas i tillägg 2 (t.ex. tropiska arter) kan det vara lämpligt med en högre temperatur. Detta förutsätter dock att kriterierna för testresultatens giltighet är uppfyllda. Kolvarna bör placeras slumpvis i inkubatorn och flyttas om dagligen.

30. Kontrollmediets pH får inte öka med mer än 1,5 enheter under testet. När det gäller metaller samt ämnen som delvis joniseras vid det använda pH-värdet kan det vara nödvändigt att begränsa pH-förskjutningen för att få fram reproducerbara och tydliga resultat. Det går att begränsa förskjutningen till mindre än 0,5 enheter om man ser till att utbytet av CO_2 mellan testlösningen och den omgivande luften är tillräckligt högt, t.ex. genom att öka skakapparatens hastighet. En annan möjlighet är att reducera behovet av CO_2 genom att minska biomassans startkoncentration eller testets längd.

31. Den yta där kulturerna inkuberas ska kontinuerligt belysas med fluorescerande ljus av enhetligt slag, t.ex. kallt vitt ljus eller dagsljus. Olika stammar av alger och cyanobakterier kan ha olika ljuskrav. Ljusets intensitet ska anpassas efter den testorganism som används. För de rekommenderade grönalgsarterna ska intensiteten mätt vid testlösningarna ligga inom intervallet 60–120 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ när mätningen görs i det fotosyntetiskt verksamma våglängdsområdet 400–700 nm med lämplig sensor. Vissa arter, särskilt *Anabaena flos-aquae*, tillväxer utan problem vid låga ljusintensiteter och kan även skadas vid höga intensiteter. För sådana arter ska den genomsnittliga ljusintensiteten ligga på 40–60 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$. (För mätinstrument som kalibrerats i lux motsvarar den rekommenderade ljusintensiteten 60–120 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ för kallt vitt ljus ungefär 4 440–8 880 lux.) Ljusintensiteten över inkuberingsytan ska ligga inom ± 15 % från genomsnittsvärdet.

▼M6

Testets varaktighet

32. Testet ska normalt pågå i 72 timmar. Man kan dock använda kortare eller längre testperioder, förutsatt att samtliga kriterier för testresultatens giltighet i punkt 11 är uppfyllda.

Mätningar och analytiska bestämningar

33. Algbiomassan i varje kolv bestäms minst en gång per dag under testperioden. Om mätningarna görs på små volymer som pipetterats från testlösningarna ska dessa volymer inte ersättas.

34. Biomassan bestäms genom manuell cellräkning i mikroskop eller med hjälp av en elektronisk partikelräknare (mätning av cellantal och/eller biovolym). Alternativa metoder, t.ex. flödescytometri, klorofyllfluorescens in vitro eller in vivo (5) (6) eller optisk täthet, kan också användas om man kan påvisa en tillfredsställande korrelation med biomassan för de värden på densamma som kan förekomma i testet.

35. Lösningarnas pH mäts i början och slutet av testet.

36. Om det finns en analytisk bestämningsmetod för testkemikalien i det valda koncentrationsintervallet ska testlösningarna analyseras för att kontrollera startkoncentrationerna och för att se till att exponeringskoncentrationerna inte förändras under testet.

37. Om det är troligt att exponeringskoncentrationerna under testet kommer att variera med mindre än 20 % från de nominella värdena kan det räcka med att man i början och slutet av testet bestämmer testkemikaliens koncentration på tre nivåer: en hög koncentration, en låg koncentration och en koncentration runt det förväntade EC_{50}-värdet. Om koncentrationerna av testkemikalien sannolikt inte kommer att hålla sig inom 80–120 % av de nominella värdena bör man i stället bestämma samtliga koncentrationer av testkemikalien vid testets början och slut. För flyktiga, instabila eller starkt adsorberande testkemikalier bör ytterligare prov för analys tas med 24 timmars mellanrum under hela exponeringstiden. På så vis får man ett säkrare mått på hur mycket av testkemikalien som försvinner. För dessa kemikalier kan extra replikat behövas. Under alla omständigheter behöver bestämningar av testkemikaliens koncentration bara göras på ett replikatkärl för varje testkoncentration (eller på det samlade innehållet från samtliga replikat).

38. Testmedier som beretts särskilt för bestämning av exponeringskoncentrationer under testet ska behandlas på samma sätt som dem som används för tester, dvs. de ympas med alger och inkuberas under identiska förhållanden. Om den lösta testkemikaliens koncentration måste bestämmas kan det vara nödvändigt att isolera algerna från mediet. Isoleringen bör helst göras genom centrifugering vid lågt g-tal (men tillräckligt högt för att algerna ska kunna avskiljas).

39. Om man kan visa att testkemikaliens koncentration på ett tillfredsställande sätt har hållits inom ± 20 % av den nominella eller uppmätta startkoncentrationen genom hela testet kan analysen av resultaten baseras på nominella eller uppmätta startvärden. Om avvikelsen från den nominella eller uppmätta startkoncentrationen inte ligger inom intervallet ± 20 % ska analysen av resultaten baseras på det geometriska medelvärdet av koncentrationen under exponeringen, eller på modeller som beskriver testkemikaliens avtagande koncentration (3) (7).

▼M6

40. Bestämning av tillväxthämning hos alger är en mer dynamisk testmetod än de flesta andra akvatiska toxicitetstester med kort testperiod. De faktiska exponeringskoncentrationerna kan därför vara svåra att bestämma, särskilt för adsorberande kemikalier som testas vid låga koncentrationer. Om kemikalien i sådana fall adsorberas till den ökande algbiomassan och därför inte längre återfinns i lösning innebär det dock inte att den försvinner från testsystemet. Vid analysen av testresultatet ska man undersöka om en minskad koncentration av testkemikalien under testperioden kan korreleras med en reducerad tillväxthämning. Om så är fallet bör man överväga att genom en lämplig modell beskriva testkemikaliens minskande koncentration (7). I annat fall kan det vara motiverat att basera resultatanalysen på testkemikaliens nominella eller uppmätta startkoncentration.

Övriga iakttagelser

41. Kontrollera i mikroskop att ympkulturen ser normal och frisk ut. I slutet av testet ska man också notera eventuella avvikelser från algernas normala utseende (som kan ha orsakats av exponeringen för testkemikalien).

Toleranstest

42. Under vissa omständigheter, t.ex. när ett preliminärt test tyder på att testkemikalien inte har några toxiska effekter vid koncentrationer upp till 100 mg/l eller upp till dess löslighetsgräns i testmediet (om denna är lägre), kan man utföra ett toleranstest. Man jämför då responsen mellan en kontrollgrupp och en testgrupp (med en koncentration på 100 mg/l eller motsvarande löslighetsgränsen). Det rekommenderas starkt att jämförelsen kompletteras med en bestämning av exponeringskoncentrationen. Alla testbetingelser samt kriterier för testresultatens giltighet som beskrivits tidigare gäller även för toleranstestet, med undantaget att antalet testreplikat ska vara minst sex. Responsvariablerna i kontroll- och testgruppen kan analyseras med hjälp av ett statistiskt test där man jämför medelvärden, t.ex. Students t-test. Om de båda grupperna inte har samma varians måste t-testet anpassas efter detta.

DATA OCH RAPPORTERING

Plottning av tillväxtkurvor

43. Mängden biomassa i testkärlen kan uttryckas i enheten för den alternativa parameter som används vid mätningen (t.ex. cellantal, fluorescens).

44. De framräknade värdena för biomassans koncentration i testkulturerna och kontrollerna förs in i en tabell tillsammans med testmaterialets koncentrationer och mättidpunkterna (noterade med en upplösning på minst hela timmar). Tabellvärdena används sedan för att ta fram plottade tillväxtkurvor. Både logaritmiska och linjära skalor kan vara användbara på detta inledande stadium, men logaritmiska skalor är obligatoriska, och de ger också i allmänhet en bättre uppfattning om variationer i tillväxtmönstret under testperioden. Observera att exponentiell tillväxt motsvaras av en rak linje när den plottas på en logaritmisk skala, och att kurvans lutning anger den specifika tillväxthastigheten.

45. Kontrollera med hjälp av plottarna om kontrollkulturerna har tillväxt exponentiellt och med förväntad hastighet under hela testet. Alla datapunkter och kurvor bör undersökas kritiskt, och rådata samt metoder bör kontrolleras med avseende på eventuella fel. Kontrollera särskilt alla datapunkter som verkar avvika på grund av systematiska fel. Om man konstaterar uppenbara eller mycket sannolika fel i testutförandet ska de berörda datapunkterna markeras som avvikande värden (”outliers”) och inte tas med i den efterföljande statistiska analysen. (Om algkoncentrationen är noll i hälften eller

▼M6

en tredjedel av kärlen med replikat kan detta tyda på att kärlen inte ympats på rätt sätt eller inte rengjorts ordentligt.) Det ska tydligt framgå av testrapporten varför en datapunkt betraktats som avvikande och därför inte använts. Det enda giltiga skälet är (enstaka) misstag i utförandet av testet. Dålig precision räknas däremot inte som ett giltigt skäl. Statistiska metoder för att identifiera avvikande värden är av begränsat värde när det gäller den här typen av problem, och de kan inte ersätta expertbedömningar. Avvikande värden (som markerats som sådana) bör helst behållas bland de datapunkter som visas i senare presentationer av data i grafisk form eller tabellform.

Responsvariabler

46. Syftet med testet är att bestämma testkemikaliens effekter på tillväxten hos alger. Eftersom olika jurisdiktioner har olika prioriteringar och lagstiftningsbehov används två responsvariabler i denna testmetod. För att testresultaten ska kunna godtas i alla jurisdiktioner ska effekterna bedömas med hjälp av båda de responsvariabler (a och b) som beskrivs nedan.

(a) Genomsnittlig specifik tillväxthastighet: responsvariabel som beräknas utifrån den logaritmiska ökningen i biomassa under testperioden, uttryckt per dygn.

(b) Producerad mängd biomassa: responsvariabel som motsvarar skillnaden mellan den ursprungliga mängden biomassa och biomassan vid testets slut.

47. Observera att toxicitetsvärden som beräknats utifrån de två responsvariablerna inte är jämförbara, och att denna skillnad måste framgå när man tillämpar testresultaten. EC_x-värden som grundar sig på den genomsnittliga specifika tillväxthastigheten (E_rC_x) är i allmänhet högre än de som grundar sig på den producerade mängden biomassa (E_yC_x) om de föreskrivna testbetingelserna i denna metod är uppfyllda, beroende på den matematiska grunden i respektive fall. Detta ska dock inte tolkas som skillnader i känslighet mellan de två responsvariablerna; avvikelserna beror i stället på att de båda metoderna är olika matematiskt konstruerade. Variabeln genomsnittlig specifik tillväxthastighet är baserad på den allmänna exponentiella tillväxten hos alger i obegränsade kulturer, där toxiciteten bestäms utifrån dess effekter på tillväxthastigheten, utan att vara beroende av vare sig det absoluta värdet på kontrollens specifika tillväxthastighet, på dos-respons-kurvans lutning, eller på testets varaktighet. Resultat som i stället grundar sig på producerad mängd biomassa är däremot beroende av alla dessa övriga variabler. E_yC_x är beroende av den specifika tillväxthastigheten för den algart som används i varje enskilt test samt av den maximala specifika tillväxthastigheten – som kan variera mellan olika arter och t.o.m. mellan olika stammar. Denna responsvariabel ska därför inte användas för att jämföra känsligheten för toxiska ämnen mellan olika arter, eller ens olika stammar. Ur vetenskaplig synpunkt är värdet på den genomsnittliga specifika tillväxthastigheten att föredra för bestämning av toxiciteten, men toxicitetsbestämning med hjälp av värdet på producerad mängd biomassa har tagits med i testmetoden för att tillgodose vissa länders nuvarande lagstiftningskrav.

Genomsnittlig tillväxthastighet

48. Den genomsnittliga specifika tillväxthastigheten under en period beräknas som den logaritmiska ökningen i biomassa för varje enskilt kärl med kontroller och testlösningar, enligt formeln [1]:

▼M6

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln X_j - \ln X_i}{t_j - t_i} (\text{dygn}^{-1}) \qquad [1],$$

där

μ_{i-j} är den genomsnittliga specifika tillväxthastigheten under tidsperioden *i*–*j*,

X_i är biomassan vid tidpunkten *i*, och

X_j är biomassan vid tidpunkten *j*.

Beräkna ett medelvärde av tillväxthastigheten för varje testgrupp och kontrollgrupp tillsammans med variansskattningar.

49. Beräkna den genomsnittliga specifika tillväxthastigheten för hela testperioden (vanligen dag 0–3). Som startvärde används det nominella värdet för ympad biomassa. Motsvarande uppmätta värde bör inte användas eftersom det i regel minskar precisionen. Om utrustningen för mätning av biomassa (t.ex. flödescytometer) ger ett tillräckligt noggrant värde på den lilla mängd som ympats kan dock biomassans uppmätta startkoncentration användas. Bestäm också den sektionsvisa tillväxthastigheten genom att beräkna den specifika tillväxthastigheten för varje dag under hela testperioden (dag 0–1, 1–2 och 2–3), och undersök om kontrollens tillväxthastighet förblir konstant (se kriterierna för testresultatens giltighet i punkt 11). En påtagligt lägre specifik tillväxthastighet under dag 1 jämfört med totalvärdet för genomsnittlig specifik tillväxthastighet kan tyda på att kulturen befinner sig i lagfas. I kontrollkulturer kan lagfasen praktiskt taget elimineras genom att förkulturen förökas på lämpligt sätt. I exponerade kulturer kan en lagfas däremot tyda på att algerna återhämtar sig efter inledande toxisk stress eller på att exponeringen minskat på grund av förlust av testkemikalien (t.ex. genom adsorption till algbiomassan) efter den inledande exponeringen. Den sektionsvisa tillväxthastigheten kan därför användas när man bestämmer testkemikaliens effekter under exponeringstiden. Stora skillnader mellan den sektionsvisa tillväxthastigheten och den genomsnittliga tillväxthastigheten tyder på att tillväxten inte varit konstant exponentiell. I sådana fall bör tillväxtkurvorna undersökas noggrant.

50. Beräkna den procentuella minskningen av tillväxthastigheten för varje replikat med testlösning genom formeln [2]:

$$\%I_r = \frac{\mu_C - \mu_T}{\mu_C} \times 100 \qquad [2],$$

där

$\%I_r$ är den procentuella minskningen av den genomsnittliga specifika tillväxthastigheten,

μ_C är medelvärdet för den genomsnittliga specifika tillväxthastigheten (μ) i kontrollgruppen, och

μ_T är den genomsnittliga specifika tillväxthastigheten för replikatet med testlösning.

51. Om man använder sig av lösningsmedel vid beredning av testlösningarna ska man vid beräkningen av procentuell tillväxthämning använda kontrollerna med lösningsmedel och inte kontrollerna utan lösningsmedel.

Producerad mängd biomassa

52. Den producerade mängden biomassa motsvarar biomassan i slutet av testet minus den ursprungliga biomassan. Beräkningen görs för varje enskilt kärl med kontroller och testlösningar. Beräkna ett medelvärde av den producerade mängden biomassa för varje testkoncentration och kontrollgrupp tillsammans med variansskattningar. Den procentuella minskningen av den producerade mängden biomassa ($\%I_y$) beräknas för varje replikat med testlösning med hjälp av formeln

▼M6

$$\%I_y = \frac{(Y_c - Y_T)}{Y_c} \times 100 \qquad [3]$$

där

$\%I_y$ är den procentuella minskningen av den producerade mängden biomassa,

Y_C är medelvärdet för den producerade mängden biomassa i kontrollgruppen, och

Y_T är den producerade mängden biomassa i replikatet med testlösning.

Plottning av dos-respons-kurvan

53. Plotta den procentuella tillväxthämningen mot logaritmen för testkemikaliens koncentration och undersök plotten noggrant. Datapunkter som konstaterats vara avvikande i den första fasen ska inte beaktas. För att man ska få en preliminär uppfattning om förhållandet mellan koncentration och respons sammanbinds datapunkterna med en jämn linje, antingen på fri hand eller med hjälp av datorbaserad interpolation. Använd därefter en mer ingående metod, helst en datorbaserad statistisk sådan. Beroende på ett flertal faktorer – t.ex. det avsedda användningsområdet för data, datakvalitet (precision), datamängd och tillgängliga analysverktyg för data – kan man (ibland på goda grunder) bestämma sig för att avsluta analysen av data på det här stadiet och enbart avläsa nyckeltalen EC_{50} och EC_{10} (och/eller EC_{20}) från kurvan som ritats på fri hand (se även avsnittet om tillväxtstimulering nedan). Det finns flera giltiga skäl för att inte använda en statistisk metod, bland annat följande:

— Det är inte troligt att man utifrån befintliga data får fram mer tillförlitliga resultat med hjälp av datorbaserade metoder än genom expertbedömningar. I sådana situationer kan det t.o.m. hända att vissa datorprogram ger ett helt otillförlitligt resultat (iterationer kanske inte konvergerar osv.).

— Stimulerande tillväxtresponser kan inte hanteras på lämpligt sätt av programvaran (se nedan).

Statistisk behandling

54. Målet är att bestämma det kvantitativa förhållandet mellan koncentration och respons med hjälp av regressionsanalys. Man kan använda viktad linjär regression efter att ha gjort en linjär transformation av responsdata, t.ex. till probit-, logit- eller Weibullvärden (8). Icke-linjära regressionsmetoder är dock att föredra, eftersom de är bättre anpassade för att hantera oundvikliga oregelbundenheter i data och avvikelser från jämna fördelningskurvor. I närheten av nollpunkten (ingen tillväxthämning) och fullständig tillväxthämning kan sådana oregelbundenheter bli felaktigt uppförstorade genom linjäriseringen och därigenom störa analysen (8). Observera att standardmetoder för analys med probit-, logit- eller Weibulltransformationer är avsedda för dikotoma data (dvs. tvåpunktsfördelade data, t.ex. dödlighet–överlevnad) och därför måste modifieras för att kunna användas för data om tillväxt eller producerad mängd biomassa. Speciella metoder för bestämning av EC_x-värden ur kontinuerliga data återfinns i (9), (10) och (11). Tillämpningen av icke-linjär regressionsanalys beskrivs utförligare i tillägg 5.

55. För varje analyserad responsvariabel används förhållandet mellan koncentration och respons för att göra punktskattningar av EC_x-värden. Om möjligt ska 95-procentiga konfidensgränser bestämmas för varje skattning. Anpassningsgraden (”goodness of fit”) mellan responsdata och regressionsmodellen ska bestämmas antingen grafiskt eller statistiskt. Regressionsanalysen ska

▼M6

göras på responsvärden från enskilda replikat, inte på medelvärden från testgrupper. Om det är svårt eller omöjligt att göra en icke-linjär kurvanpassning på grund av alltför stor spridning av data kan man i stället göra regressionen utifrån gruppmedelvärdena. Detta är en praktisk metod för att minska påverkan från misstänkta avvikande värden. Om man använder sig av denna möjlighet ska det tas med i testrapporten som en avvikelse från det normala förförandet, och motiveras med att kurvanpassningar med enskilda replikat inte gav tillfredsställande resultat.

56. När tillgängliga regressionsmodeller eller regressionsmetoder inte lämpar sig för de aktuella dataserierna kan skattningar av EC_{50}-värden och konfidensgränser också bestämmas genom linjär interpolation och bootstrapping (13).

57. För skattningar av LOEC (och därmed även av NOEC) för testkemikaliens inverkan på tillväxthastigheten jämförs medelvärden från testlösningarna med hjälp av variansanalysmetoder (ANOVA). Medelvärdet för varje koncentration jämförs sedan med medelvärdet för kontrollerna med hjälp av en lämplig metod för multipeljämförelse eller trendtest, t.ex. Dunnetts eller Williams test (12) (14) (15) (16) och (17). Man måste avgöra om antagandet för ANOVA om varianshomogenitet är uppfyllt. Detta kan göras grafiskt eller med ett etablerat test (17), t.ex. Levenes eller Bartletts test. Skulle antagandet om varianshomogenitet inte vara uppfyllt kan man ibland korrigera för detta genom logaritmisk transformation av data. Om heterogeniteten i variansen är extremt stor och inte kan korrigeras genom transformation, ska man överväga att göra analysen med t.ex. Jonkheeres trendtester av ”step-down”-typ. Mer information om bestämning av NOEC finns i (11).

58. Nya forskningsrön har lett till att man avråder från användning av NOEC-värden. I stället rekommenderas att man använder punktskattningar av EC_x baserade på regressionsanalys. För detta algtest har ännu inget passande värde på x fastställts. Ett intervall på 10–20 % förefaller dock vara lämpligt, beroende på vilken responsvariabel som används. Både EC_{10} och EC_{20} bör anges i testrapporten.

Tillväxtstimulering

59. Ibland förekommer tillväxtstimulering (negativ hämning) vid låga koncentrationer. Detta kan antingen bero på hormesis (”toxisk stimulering”) eller på att stimulerande tillväxtfaktorer överförts från testmaterialet till det minimalmedium som används. Observera att tillsats av oorganiska näringsämnen inte bör ha någon direkt effekt, eftersom testmediet bör innehålla ett överskott av näringsämnen i förhållande till algernas behov under hela testperioden. Vid beräkningen av EC_{50} kan man vanligen bortse från stimulering vid låga koncentrationer, såvida inte stimuleringen är extremt stor. I det senare fallet – samt då man beräknar EC_x för låga värden på x – kan det dock krävas särskilda åtgärder. Man ska så långt det är möjligt ta med stimulerande responser vid analysen av data, och om befintliga dataprogram för kurvanpassning inte kan hantera låggradig stimulering kan man i stället använda sig av linjär interpolation med bootstrapping. Om stimuleringen är extremt stor kan man överväga att använda en hormesis-modell (18).

Icke-toxisk tillväxthämning

60. Ljusabsorberande testmaterial kan påverka tillväxthastigheten negativt eftersom de minskar mängden tillgängligt ljus. Sådana fysikaliska effekter måste kunna särskiljas från toxiska effekter genom att man ändrar testförhållandena, och fysikaliska effekter ska rapporteras separat. Riktlinjer återfinns i (2) och (3).

TESTRAPPORT

61. Testrapporten ska innehålla följande uppgifter:

▼**M6**

Testkemikalie:

— fysikalisk form samt relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper, inbegripet löslighetsgräns i vatten,

— kemiska identifieringsuppgifter (t.ex. CAS-nummer), inklusive renhetsgrad (föroreningar).

Testade arter:

— stam, leverantör eller ursprung, samt odlingsförhållanden.

Testbetingelser:

— startdatum och varaktighet för testet,

— testupplägg: testkärl, kulturernas volym, biomassans koncentration i början av testet,

— mediets sammansättning,

— testkoncentrationer och replikat (t.ex. antal replikat, antal testkoncentrationer samt geometrisk serie),

— metod för beredning av testlösningar, inbegripet användning av lösningsmedel m.m.,

— odlingsutrustning,

— ljusets intensitet och kvalitet (ljuskälla, homogenitet),

— temperatur,

— de koncentrationer som testats: de nominella testkoncentrationerna och resultaten av alla analyser för att fastställa koncentrationen av testkemikalien i testkärlen. Metodens utbyte och bestämningsgräns i matrisen,

— alla avvikelser från denna testmetod,

— metod för bestämning av biomassa, samt belägg för att det finns en korrelation mellan den uppmätta parametern och biomassans torrvikt.

Resultat:

— pH-värde vid testets början och slut i alla testlösningar,

— biomassa för varje kolv och varje mätpunkt, samt metod för att mäta biomassa,

— tillväxtkurvor (plott där biomassan avsatts mot tiden),

— beräknade responsvariabler för respektive testreplikat, inklusive medelvärden och variationskoefficient för replikaten,

— grafisk framställning av förhållandet mellan koncentration och effekt,

▼M6

— toxicitetsbestämningar för responsvariablerna, t.ex. EC_{50}, EC_{10} och EC_{20} samt dithörande konfidensintervall. Om man räknat fram LOEC- och NOEC-värden ska dessa anges, liksom de statistiska metoder som använts vid beräkningen,

— om ANOVA-metoder har använts: storleken på observerad effekt (t.ex. minsta signifikanta skillnad),

— eventuell tillväxtstimulans som har konstaterats i testlösningarna,

— övriga observerade effekter, t.ex. morfologiska förändringar hos algerna,

— diskussion av resultaten, inbegripet eventuell inverkan på testresultatet som kan tillskrivas avvikelser från denna testmetod.

LITTERATUR

(1) Internationella standardiseringsorganisationen (1993). ISO 8692 Vattenundersökningar – Metod för bestämning av tillväxthämning hos encelliga sötvattenslevande grönalger.

(2) Internationella standardiseringsorganisationen (1998). ISO/DIS 14442. Water quality – Guidelines 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 Safety Publications. Series on Testing and Assessment, nr 23. Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling (OECD), Paris.

(4) Internationella standardiseringsorganisationen (1998). ISO 5667-16 Vattenundersökningar – Provtagning – Del 16: Riktlinjer för biologiska tester.

(5) Mayer, P., Cuhel, R. och Nyholm, N. (1997). A simple in vitro fluorescence method for biomass measurements in algal growth inhibition tests. *Water Research* 31: 2525–2531.

(6) Slovacey, R. E. och Hanna, P. J. (1997). In vivo fluorescence determinations of phytoplancton chlorophyll. Limnology & Oceanography 22: 919–925.

(7) Simpson, S. L., Roland, M. G. E., Stauber, J. L. och Batley, G. E. (2003). Effect of declining toxicant concentrations on algal bioassay endpoints. *Environ. Toxicol. Chem.* 22: 2073–2079.

(8) Christensen, E. R. och Nyholm, N. (1984). Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves. *Env. Sci. Technol*. 19: 713–718.

(9) Nyholm, N., Sørensen, P. S., Kusk, K. O. och Christensen, E. R. (1992). Statistical treatment of data from microbial toxicity tests. *Environ. Toxicol. Chem*. 11: 157–167.

(10) Bruce, R. D. och Versteeg, D. J. (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 för ekonomiskt samarbete och utveckling (OECD), Paris.

▼**M6**

(12) Dunnett, C. W. (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) Dunnett, C. W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics 20: 482–491.

(15) 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.

(16) Williams, D. A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28: 519–531.

(17) Draper, N. R. och Smith, H. (1981). Applied Regression Analysis, andra upplagan. Wiley, New York.

(18) Brain P. och Cousens R. (1989). An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses. *Weed Research* 29, 93–96.

▼M6

Tillägg 1

Definitioner

Följande definitioner och förkortningar används i denna testmetod:

Biomassa: torrvikten av all levande substans i en population, uttryckt per volymenhet, t.ex. mg alger/liter testlösning. Biomassa definieras vanligen som en vikt, men i det här testet används alltså i stället vikt per volymenhet. Begreppet biomassa används också i testet för att ange resultatet av alternativa mätmetoder, t.ex. cellräkning och mätning av fluorescens.

Kemikalie: ett ämne eller en blandning

Variationskoefficient: dimensionslöst mått på en parameters variabilitet, definierat som förhållandet mellan standardavvikelsen och medelvärdet. Detta kan också uttryckas i procent. Variationskoefficientens medelvärde för den genomsnittliga specifika tillväxthastigheten i kontrollreplikaten beräknas enligt följande:

1. beräkna variationskoefficienten (i procent) för den genomsnittliga specifika tillväxthastigheten utifrån de dagliga sektionsvisa tillväxthastigheterna för respektive replikat,

2. beräkna medelvärdet för alla värden som erhållits i punkt 1 för att få fram den genomsnittliga variationskoefficienten för den dagliga sektionsvisa specifika tillväxthastigheten i kontrollreplikaten.

EC_x: den koncentration av testkemikalien, löst i testmediet, som minskar testorganismens tillväxt med x % (t.ex. 50 %) efter en given exponeringstid (som tydligt måste anges om man avviker från den fulla eller normala testperioden). För att entydigt ange om EC-värdet bygger på tillväxthastighet eller producerad mängd biomassa används beteckningen E_rC för tillväxthastighet och E_yC för producerad mängd biomassa.

Odlingsmedium: det kompletta syntetiska medium som algerna växer i när de exponeras för testkemikalien. Testkemikalien är vanligen löst i testmediet.

Tillväxthastighet (genomsnittlig specifik tillväxthastighet): logaritmisk ökning av mängden biomassa under exponeringstiden.

Lägsta koncentration med observerad effekt (LOEC – ”Lowest Observed Effect Concentration”): den lägsta testade koncentration vid vilken man kan fastställa att testkemikalien har en statistiskt signifikant hämmande effekt på tillväxten (vid $p < 0,05$) efter en given exponeringstid, jämfört med kontrollen. Alla testkoncentrationer ovanför LOEC måste ha skadliga verkningar som är lika stora som eller större än de verkningar som observeras vid LOEC. Om dessa två villkor inte är uppfyllda måste en fullständig förklaring ges till hur man har valt LOEC (och därmed NOEC).

Nolleffektkoncentration (NOEC – ”No Observed Effect Concentration”): testkoncentrationen omedelbart under LOEC.

Responsvariabel: variabel för bestämning av toxicitet. Variabeln fås fram genom att olika beräkningsmetoder tillämpas på uppmätta parametrar för biomassa. För den här testmetoden är tillväxthastighet och producerad mängd biomassa responsvariabler som erhålls genom att biomassan mäts antingen direkt eller med någon av de angivna alternativa mätmetoderna.

▼M6

Specifik tillväxthastighet: responsvariabel som definieras som kvoten av skillnaden mellan de naturliga logaritmerna för en observerad parameter (i den här testmetoden: biomassa) och motsvarande tidsperiod.

Testkemikalie: alla ämnen eller blandningar som testas med denna testmetod.

Producerad mängd biomassa: värdet på en mätvariabel i slutet av exponeringstiden minus motsvarande värde i början av exponeringstiden, använt som ett mått på ökningen av biomassa under testet.

▼M6

Tillägg 2

Rekommenderade stammar

Grönalger

Pseudokirchneriella subcapitata (äldre namn: *Selenastrum capricornutum*), ATCC 22662, CCAP 278/4, 61.81 SAG

Desmodesmus subspicatus (äldre namn: *Scenedesmus subspicatus*) 86.81 SAG

Kiselalger

Navicula pelliculosa, UTEX 664

Cyanobakterier

Anabaena flos-aquae, UTEX 1444, ATCC 29413, CCAP 1403/13A

Synechococcus leopoliensis, UTEX 625, CCAP 1405/1

Stammarnas ursprung

De rekommenderade stammarna finns att tillgå som monokulturer från följande samlingar (alfabetisk ordning):

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
STORBRITANNIEN

SAG: Sammlung von Algenkulturen
Albrecht-von-Haller-Institut
Universität Göttingen
Nikolausberger Weg 18
37073 Göttingen
TYSKLAND

UTEX Culture Collection of Algae
Section of Molecular, Cellular and Developmental Biology
School of Biological Sciences
University of Texas at Austin
Austin, Texas 78712
USA

▼M6

Form och övriga egenskaper hos rekommenderade arter

	P. subcapitata	*D. subspicatus*	*N. pelliculosa*	*A. flos-aquae*	*S. leopoliensis*
Form	Böjda och vridna enskilda celler	Ovala, vanligen enskilda celler	Stavar	Kedjor av ovala celler	Stavar
Storlek (längd × bredd) (μm)	8–14 × 2–3	7–15 × 3–12	7,1 × 3,7	4,5 × 3	6 × 1
Volym (μm^3/cell)	40–60 (1)	60–80 (1)	40–50 (1)	30–40 (1)	2,5 (2)
Torrvikt (mg/cell)	$2–3 \times 10^{-8}$	$3–4 \times 10^{-8}$	$3–4 \times 10^{-8}$	$1–2 \times 10^{-8}$	$2–3 \times 10^{-9}$
Tillväxthastighet (3) ($dygn^{-1}$)	1,5 –1,7	1,2–1,5	1,4	1,1–1,4	2,0–2,4

(1) Uppmätt med elektronisk partikelräknare.
(2) Beräknat på grundval av storleken.
(3) Den vanligast observerade tillväxthastigheten i OECD-medium vid en ljusintensitet på ungefär 70 $\mu E\ m^{-2}\ s^{-1}$ och en temperatur på 21 °C.

Särskilda rekommendationer om odling och hantering av rekommenderade testarter

Pseudokirchneriella subcapitata och Desmodesmus subspicatus

Dessa grönalger brukar vara lätta att hålla i olika odlingsmedier. Råd om lämpliga medier kan fås från de institutioner som ansvarar för algsamlingarna. Cellerna är vanligen enskilda, och celltätheten kan enkelt bestämmas med hjälp av elektronisk partikelräknare eller mikroskop.

Anabaena flos-aquae

Olika odlingsmedier kan användas för stamkulturen. Det är mycket viktigt att batchkulturen fortfarande befinner sig i logfas då den förnyas, eftersom den annars har svårt att återhämta sig.

Anabaena flos-aquae bildar aggregat bestående av hopnystade kedjor av celler. Aggregatens storlek kan variera beroende på odlingsförhållandena. Om biomassan bestäms genom räkning i mikroskop eller med hjälp av en elektronisk partikelräknare kan det vara nödvändigt att först bryta sönder aggregaten.

Sonikering av prov kan användas för att bryta sönder kedjor av celler och därigenom minska variabiliteten vid räkning. Längre sonikering än vad som krävs för att bryta sönder kedjorna i småfragment kan dock förstöra cellerna. Soniker-ingens intensitet och varaktighet ska vara densamma för varje testlösning.

Räkna tillräckligt många fält på hemocytometern (minst 400 celler) för att kompensera för variabiliteten. På så vis ökar tillförlitligheten hos de mikroskopiska täthetsbestämningarna.

Den totala cellvolymen för *Anabaena* kan bestämmas med hjälp av en elektronisk partikelräknare. Först måste dock cellkedjorna brytas sönder genom försiktig sonikering. Anpassa sonikeringsenergin så att cellerna inte sprängs.

Använd vortexblandare eller liknande för att se till att den algsuspension som används för att ympa testkärlen är väl blandad och har homogen konsistens.

▼M6

Testkärlen placeras i ett skakbord med rund- eller längsgående rörelse, hastighet ca 150 rpm. Ett alternativ är att man med jämna mellanrum skakar kärlen för att undvika att *Anabaena* bildar klumpar. Om klumpar ändå bildas måste man se till att de prov som tas för mätning av biomassa är representativa. Det kan vara nödvändigt att skaka kärlen kraftigt före provtagning för att klumparna ska lösas upp.

Synechococcus leopoliensis

Olika odlingsmedier kan användas för stamkulturen. Råd om lämpliga medier kan fås från de institutioner som ansvarar för algsamlingarna.

Synechococcus leopoliensis växer som enskilda, stavformiga celler. Cellerna är mycket små, vilket försvårar bestämning av biomassan genom räkning av celler i mikroskop. Elektroniska partikelräknare anpassade för partiklar ned till ung. 1 μm kan användas, och man kan även göra fluorimetriska mätningar in vitro.

Navicula pelliculosa

Olika odlingsmedier kan användas för stamkulturen. Råd om lämpliga medier kan fås från de institutioner som ansvarar för algsamlingarna. Observera att mediet måste innehålla silikat.

Navicula pelliculosa kan under vissa odlingsförhållanden bilda aggregat. Detta beror på att fett som producerats av algerna ibland ansamlas i en ytfilm till vilken de enskilda algcellerna lätt vidhäftas. När detta sker måste man se till att de prov som tas för bestämning av biomassa är representativa, t.ex. genom kraftig skakning i vortexblandare.

▼**M6**

Tillägg 3

Odlingsmedier

Man kan välja mellan två odlingsmedier:

— OECD-medium: originalmedium enligt OECD TG 201, samt enligt ISO 8692

— AAP-medium enligt den amerikanska miljöskyddsmyndigheten (EPA), samt enligt ASTM.

Vid beredning av medierna ska kemikalier av reagenskvalitet eller p.a.-kvalitet användas, och vattnet ska vara avjonat.

Sammansättningen av AAP-medium (enl. EPA) och OECD TG 201-medium

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 molara förhållandet mellan EDTA och järn ska vara något större än 1. På så vis förhindras utfällning av järn samtidigt som kelateringen av tungmetalljoner minimeras.

I testet med kiselalgen *Navicula pelliculosa* berikas båda medierna med $Na_2SiO_3 \cdot 9H_2O$ så att koncentrationen av kisel (Si) blir 1,4 mg/l.

▼**M6**

Mediets pH hålls i jämvikt genom karbonatsystemet i mediet och partialtrycket för CO_2 i den omgivande luften. Ett ungefärligt förhållande mellan pH vid 25 °C och den molara koncentrationen av bikarbonat ges av formeln

$pH_{eq} = 11{,}30 + \log[HCO_3]$

Med 15 mg $NaHCO_3$/l är $pH_{eq} = 7{,}5$ (AAP-medium enl. EPA), och med 50 mg $NaHCO_3$/l är $pH_{eq} = 8{,}1$ (OECD-medium).

Testmediernas grundämnessammansättning

Grundämne	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

Beredning av OECD-medium

Näringsämne	Koncentration i stamlösningen
Stamlösning 1: makro-näringsämnen	
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
Stamlösning 2: järn	
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	64 mg/l
$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	100 mg/l
Stamlösning 3: mikro-näringsämnen	
H_3BO_3	185 mg/l
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	415 mg/l
$ZnCl_2$	3 mg/l

▼**M6**

Näringsämne	Koncentration i stamlösningen
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	1,5 mg/l
$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0,01 mg/l
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	7 mg/l
Stamlösning 4: bikarbonat	
$NaHCO_3$	50 g/l
$Na_2SiO_3 \cdot 9H_2O$	

Sterilisera stamlösningarna genom membranfiltrering (genomsnittlig pordiameter 0,2 μm) eller autoklavering (120 °C, 15 min). Lösningarna förvaras i mörker vid 4 °C.

Stamlösningarna 2 och 4 autoklaveras inte, utan steriliseras genom membranfiltrering.

Odlingsmediet bereds genom att man tillsätter lämpliga volymer av stamlösningarna 1–4 till vatten.

Till 500 ml steriliserat vatten tillsätts:

10 ml av stamlösning 1

1 ml av stamlösning 2

1 ml av stamlösning 3

1 ml av stamlösning 4

Späd till 1 000 ml med steriliserat vatten.

Vänta tills mediet befinner sig i jämvikt med den omgivande luften med avseende på CO_2. Vid behov kan processen påskyndas genom att mediet bubblas med steril, filtrerad luft i några timmar.

Beredning av AAP-medium (enl. EPA)

1. Tillsätt 1 ml av var och en av stamlösningarna i 2.1–2.7 till ung. 900 ml avjonat eller destillerat vatten och späd till 1 liter.

2. Stamlösningar med makronäringsämnen bereds genom att kemikalierna nedan löses i 500 ml avjonat eller destillerat vatten. Reagensen 2.1, 2.2, 2.3 och 2.4 kan kombineras till en stamlösning.

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	Stamlösning med mikronäringsämnen (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 anm. 1.

▼**M6**

Anm. 1: Används bara för kiselalger. Kemikalien kan tillsättas direkt (202,4 mg) eller via en stamlösning. Slutkoncentrationen av kisel (Si) i mediet ska i båda fallen vara 20 mg/l.

3. Stamlösningen med mikronäringsämnen bereds genom att kemikalierna nedan löses i 500 ml avjonat eller destillerat vatten.

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	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0,714 mg	
3.6	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	3,630 mg	
3.7	$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0,006 mg	
3.8	$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	150,000 mg	[dinatrium(etylendinitril)tetraacetat]
3.9	$Na_2SeO_4 \cdot 5H_2O$	0,005 mg. Se anm. 2.	

Anm. 2: Används bara för stamkulturer av kiselalger.

4. Justera pH till 7,5 ± 0,1 med 0,1 *N* eller 1,0 *N* NaOH eller HCl.

5. Om man använder sig av en elektronisk partikelräknare ska mediet filtreras över till ett sterilt kärl genom ett membranfilter med en pordiameter på 0,22 μm. Om partikelräknare inte används ska filtrets pordiameter i stället vara 0,45 μm.

6. Mediet lagras i mörker vid ung. 4 °C tills det används.

▼M6

Tillägg 4

Exempel på en metod för algodling

Allmänna påpekanden

Syftet med odling enligt följande metod är att få fram algkulturer för toxicitetstester.

Man måste vidta lämpliga åtgärder för att förhindra att algkulturerna kontamineras med bakterier. Utgångsmaterialet ska bestå av monokulturer, och helst axeniska sådana.

Alla moment ska utföras under sterila förhållanden för att undvika kontaminering med bakterier eller andra alger.

Utrustning och material

Se under testmetod: Utrustning

Odling av algkulturer

Beredning av näringslösningar (näringsmedier):

Alla närsalter i mediet bereds som koncentrerade stamlösningar och lagras i mörker vid låg temperatur. Lösningarna steriliseras genom filtrering eller autoklavering.

Mediet bereds genom att man tillsätter angiven mängd stamlösning till sterilt destillerat vatten. Kontaminering med mikroorganismer måste undvikas. För fasta medier tillsätts 0,8 % agar.

Stamkultur:

Stamkulturerna är små algkulturer som regelbundet överförs till färskt medium och som används som utgångstestmaterial. Om kulturerna inte används regelbundet ska de strykas ut på böjda agarrör. Dessa överförs till färskt medium minst en gång varannan månad.

Stamkulturerna odlas i E-kolvar med lämpligt medium (volym ca 100 ml). Om algerna inkuberas vid 20 °C i kontinuerligt ljus måste överföringar göras en gång i veckan.

Vid detta moment överför man med hjälp av en steril pipett en viss mängd ”gammal” kultur till en kolv med färskt medium så att initialkoncentrationen för snabbväxande arter är ca 100 gånger lägre än i den gamla kulturen.

Tillväxttakten för en viss art kan bestämmas utifrån tillväxtkurvan. Med hjälp av detta värde kan man sedan räkna fram vid vilken celltäthet kulturen ska överföras till nytt medium. Detta måste göras innan kulturen når deklinationsfasen.

Förkultur:

Avsikten med förkulturen är att få en mängd alger som är lämpliga för ympning av testkulturer. Förkulturen inkuberas under testbetingelser och används medan den ännu växer exponentiellt, vanligen efter en inkuberingsperiod på 2–4 dagar. Algkulturer som innehåller deformerade eller avvikande celler kastas bort.

▼M6

Tillägg 5

Analys Av Data Med Icke-Linjär Regression

Allmänna överväganden

Responsen i algtester och andra tester som gäller mikrobiell tillväxt (tillväxt av biomassa) är per definition en kontinuerlig, eller metrisk, variabel. Det rör sig om hastigheten hos en process i de fall man mäter tillväxthastighet, och integralen av motsvarande kurva om man i stället mäter biomassa. Båda variablerna jämförs sedan med motsvarande genomsnittsrespons för icke-exponerade kontrollreplikat som uppvisar maximal respons under de rådande förhållandena – med ljus och temperatur som viktigaste faktorer i algtestet. Systemet kan vara uppdelat eller homogent, och biomassan kan anses utgöra en helhet där man inte behöver ta hänsyn till enskilda celler. Variansfördelningen för responsen i ett sådant system beror uteslutande på experimentella faktorer (där felen vanligen är lognormalfördelade eller normalfördelade). Detta ska jämföras med typiska responser i biologiska tester med dikotoma data där toleransen (som vanligen är binomialfördelad) hos enskilda organismer ofta antas vara det dominerande elementet i variansen. Responsen i kontrollerna är i detta fall noll eller har samma värde som bakgrundsnivån.

I det enklaste fallet minskar den normaliserade eller relativa responsen r monotont från värdet 1 (ingen tillväxthämning) till 0 (100 % tillväxthämning). Man bör vara medveten om att alla responser innehåller fel, och att uppenbar negativ hämning vid beräkningen uteslutande anses bero på slumpmässiga fel.

Regressionsanalys

Modeller

Syftet med en regressionsanalys är att kvantitativt beskriva dos-respons-kurvan i form av en matematisk regressionsfunktion, $Y = f(C)$ eller – vanligare – $F(Z)$, där $Z = \log C$. Använd på motsatt sätt kan funktionen $C = f^{-1}(Y)$ utnyttjas för beräkning av EC_x-värden, t.ex. EC_{50}, EC_{10} och EC_{20}, samt motsvarande 95-procentiga konfidensgränser. Ett flertal enkla matematiska funktioner har visat sig vara lämpliga för att beskriva förhållandet mellan koncentration och respons vid bestämning av tillväxthämning hos alger. Dessa funktioner innefattar t.ex. den logistiska ekvationen, den icke-symmetriska Weibull-ekvationen samt funktionen för lognormalfördelning. De är alla sigmoida kurvor som asymptotiskt närmar sig värdet noll för $C \rightarrow 0$ och värdet ett då $C \rightarrow$ oändligheten.

Ett nyligen framlagt alternativ till asymptotiska modeller är modeller som bygger på kontinuerliga tröskelfunktioner (t.ex. Kooijman-modellen för tillväxthämning avseende populationer, se Kooijman m.fl. 1996). Modellen bygger på antagandet att det inte förekommer några effekter under ett visst tröskelvärde EC_0+ som bestäms genom extrapolation av dos-respons-kurvan till den punkt där den korsar koncentrationsaxeln. Man använder sig då av en enkel kontinuerlig funktion som inte är differentierbar i startpunkten.

Observera att analysen kan bestå av en enkel minimering av residualkvadratsummor (om man antar att variansen är konstant) eller av viktade kvadrater, om man kompenserar för variansens heterogenitet.

Förfarande

Förfarandet är i korthet följande: Välj en lämplig funktion, $Y = f(C)$, och anpassa den till data genom icke-linjär regression. För att man ska kunna få ut så mycket information som möjligt från mätdata bör man använda mätvärden från varje enskild kolv i stället för medelvärden för samtliga replikat. Om variansen å andra

▼M6

sidan är hög visar erfarenheten att medelvärden för replikaten troligen kan ge en matematisk uppskattning som är mer tillförlitlig och mindre påverkad av slumpmässiga fel i data än en metod där man behåller varje enskild datapunkt.

Plotta den anpassade kurvan och erhållna mätdata, och kontrollera att kurvans anpassning är godtagbar. Analys av residualer kan vara ett särskilt användbart verktyg för detta ändamål. Om den valda funktionen för anpassning av dos-respons-kurvan ger en otillfredsställande beskrivning av hela kurvan eller en väsentlig del av denna, t.ex. responsen vid låga koncentrationer, bör man välja en annan typ av kurvanpassning som inte är symmetrisk, t.ex. Weibull-funktionen. Negativ hämning kan ge problem då man använder sig av t.ex. funktionen för lognormalfördelning. Också i detta fall bör man välja en alternativ regressionsfunktion. Det är inte lämpligt att sådana negativa värden tilldelas värdet noll eller ett lågt positivt värde eftersom detta rubbar felfördelningen. Det kan vara befogat att göra separata anpassningar för olika delar av kurvan. Exempelvis kan värdet på $EC_{low\ x}$ uppskattas från den del av kurvan där tillväxthämningen är låg. Beräkna från den anpassade ekvationen (genom ”omvänd uppskattning”, $C = f^{-1}(Y)$) karaktäristiska punktskattningar för EC_x-värden. I rapporten ska åtminstone EC_{50} samt en eller två uppskattningar av $EC_{low\ x}$ tas med. Den praktiska erfarenheten har visat att algtestet vanligen medger en rimligt noggrann uppskattning vid 10 % tillväxthämning, förutsatt att det finns tillräckligt många datapunkter. Undantaget är de fall då tillväxtstimulering skett vid låga koncentrationer av testkemikalien. Uppskattningar av EC_{20} brukar ha betydligt högre precision än uppskattningar av EC_{10}, eftersom EC_{20} vanligen befinner sig på den approximativt linjära delen av den centrala dos-respons-kurvan. Ibland kan EC_{10}-värden vara svåra att tolka på grund av tillväxtstimulering. Även om man vanligen får fram EC_{10} med tillräckligt hög noggrannhet bör EC_{20} också alltid rapporteras.

Viktningsfaktorer

Eftersom den experimentella variansen vanligen inte är konstant och normalt sett innehåller en proportionell komponent bör man rutinmässigt göra en viktad regression. Viktningsfaktorerna vid en sådan analys antas vanligen vara omvänt proportionella mot variansen:

$$W_i = 1/Var(r_i)$$

Många regressionsprogram har en funktion för viktad regressionsanalys där viktningsfaktorerna tas från en tabell. Det är lämpligt att man normaliserar viktningsfaktorerna genom att multiplicera dem med $n/\Sigma\ w_i$ (där n är antalet datapunkter) så att summan av dem blir ett.

Normalisering av responser

Normalisering med medelvärdet för kontrollernas responser innebär vissa principiella problem och leder också till en ganska komplicerad variansstruktur. Om man delar responsvärdena med medelvärdet för kontrollernas responser för att få fram den procentuella tillväxthämningen inför man samtidigt ett nytt fel på grund av det fel som är kopplat till medelvärdet för kontrollerna. Om detta fel inte är att betrakta som försumbart måste viktningsfaktorerna för regression och konfidensgränser korrigeras för kovariansen med kontrollen (Draper och Smith, 1981). För att den totala variansen för den relativa responsen ska kunna minimeras är det viktigt att det uppskattade medelvärdet för kontrollernas respons har en hög precision. Variansen uttrycks på följande sätt:

(Nedsänkt i hänför sig till koncentrationsnivån i, och nedsänkt 0 till kontrollerna.)

$$Yi = \text{Relativ respons} = r_i/r_0 = 1 - I = f(C_i)$$

▼M6

med variansen $Var(Y_i) = Var(r_i/r_0) \cong (\partial Yi / \partial r_i)^2 \cdot Var(r_i) + ((\partial Y_i/ \partial r_0)^2 \cdot Var(r_0)$

och eftersom $(\partial Y_i/ \partial r_i) = 1/r_0$ och $(\partial Y_i/ \partial r_0) = r_i/r_0^2$

med normalt fördelade data och replikaten m_i och m_0: $Var(r_i) = \sigma^2/m_i$

blir den totala variansen för den relativa responsen Y_i således

$$Var(Y_i) = \sigma^2/(r_0^2 \cdot m_i) + r_i^2 \cdot \sigma^2/r_0^4 \cdot m_0$$

Felet för medelvärdet för kontrollerna är omvänt proportionellt mot kvadratroten av genomsnittsvärdet för antalet kontrollreplikat. Det kan ibland vara befogat att ta med historiska data för att kraftigt minska felet. En alternativ metod går ut på att man inte normaliserar data eller anpassar de absoluta responserna – inbegripet responsvärden för kontroller – utan i stället tar med responsvärden för kontroller som en extra parameter som anpassas genom icke-linjär regression. Om man använder sig av en regressionsformel av standardtyp med två parametrar kräver metoden anpassning av tre parametrar, vilket innebär att det krävs fler datapunkter än vid icke-linjär regression av data som normaliserats med hjälp av en förvald kontrollrespons.

Omvända konfidensintervall

Beräkningen av konfidensintervall vid icke-linjär regression genom omvänd uppskattning är ganska komplex och förekommer inte som standardfunktion i normala statistikprogrampaket. Ungefärliga konfidensgränser kan erhållas med hjälp av standardprogram för icke-linjär regression med omparametrisering (Bruce och Versteeg, 1992), vilket innebär att den matematiska ekvationen skrivs om med önskade punktskattningar, t.ex. med EC_{10}- och EC_{50}-värden som de parametrar som ska uppskattas. (Låt funktionen vara $I = f(\alpha, \beta,$ koncentration) och använd definitionsrelationerna $f(\alpha, \beta, EC_{10}) = 0{,}1$ och $f(\alpha, \beta, EC_{50}) = 0{,}5$ för att ersätta $f(\alpha, \beta,$ koncentration) med en likvärdig funktion $g(EC_{10}, EC_{50},$ koncentration.)

En mer direkt beräkning (Andersen m.fl., 1998) kan göras genom att man behåller den ursprungliga ekvationen och använder sig av en Taylorexpansion runt medelvärdena för r_i och r_0.

Metoder med bootstrapping har blivit populära på senare tid. De går ut på att man uppskattar en empirisk variansfördelning med hjälp av erhållna mätdata i kombination med återkommande omsampling som styrs av en slumptalsgenerator.

LITTERATUR

Kooijman, S. A. L. M., Hanstveit, A. O. och Nyholm, N. (1996). No-effect concentrations in algal growth inhibition tests. *Water Research*, 30, 1625–1632.

Draper, N. R. och Smith, H. (1981). Applied Regression Analysis, andra upplagan. Wiley, New York.

Bruce, R. D. och Versteeg, D. J. (1992). A Statistical Procedure for Modelling Continuous Ecotoxicity Data. *Environ. Toxicol. Chem*. 11, 1485–1494.

Andersen, J. S., Holst, H., Spliid, H., Andersen, H., Baun, A. och Nyholm, N. (1998). Continuous ecotoxicological data evaluated relative to a control response. *Journal of Agricultural, Biological and Environmental Statistics*, 3, 405–420.

▼B

C.4 BESTÄMNING AV ”LÄTT” BIONEDBRYTBARHET

DEL I. ALLMÄNNA PRINCIPER

I.1 INLEDNING

Sex metoder för screening av kemikalier för lätt bionedbrytning i ett aerobt vattenmedium beskrivs:

a) Eliminering av upplöst organiskt kol (DOC) (Metod C.4-A).

b) Modifierat OECD-screeningtest – eliminering av DOC (Metod C.4-B).

c) Koldioxid (CO_2) utvärdering (Modifierat Sturmtest) (Metod C.4-C).

d) Manometrisk respiration (Metod C.4-D).

e) Closed Bottle Test (Metod C.4-E).

f) MITI (Ministry of International Trade and Industry – Japan) (Metod C.4-F).

Del 1 innehåller allmänna och generella kommentarer till alla sex tester. I del II–VI1 finns det som är specifikt för de enskilda testerna. Tilläggen innehåller definitioner, formler och vägledande upplysningar.

1988 genomförde OECD ett ringtest som visade att metoderna ger inbördes överensstämmande resultat. En bestämd metod kan dock föredras allt efter det undersökta ämnets fysiska egenskaper.

I.2 VAL AV METOD

För att kunna välja den lämpligaste metoden är det viktigt att känna till kemikaliens löslighet, ångtryck och adsorptionsegenskaper. Den kemiska strukturen eller formeln bör vara känd för att kunna beräkna teoretiska värden och kontrollera uppmätta värden av parametrar, t.ex. ThOD, $ThCO_2$, DOC, TOC och COD (se bilagorna 1 och 2).

Testkemikalier som är lösliga i vatten med 100 mg/liter kan utvärderas genom samtliga metoder, under förutsättning att de är icke-flyktiga och icke adsorberande. Av tabell 1 framgår vilka metoder som är lämpliga för kemikalier som är svårlösliga i vatten, flyktiga eller adsorberande. I bilaga I beskrivs hur man ska göra med kemikalier som är svårupplösliga i vatten och flyktiga kemikalier. Moderat flyktiga kemiska ämnen kan testas genom DOC elimineringsmetoden om det finns tillräckligt med luftrum i testkärlet (som ska stängas på lämpligt sätt). 1 detta fall måste en abiotisk kontroll användas som tillåter eventuell fysisk förlust.

▼B

Tabell 1

Tillämpning av testmetoder

Test	Analytisk metod	Lämplighet för ämnen som är		
		svårlösliga	flyktiga	adsorberande
DOC-eliminering	Upplöst organiskt kol	—	—	+/-
Mod. OECD DOC-elim.	Upplöst organiskt kol	—	—	+/-
CO_2 utvärdering	Respirometri: CO_2 bedömning	+	—	+
Manometrisk respirometri	Manometrisk respirometri: syreförbrukning	+	+/-	+
Closed bottle	Respirometri: upplöst syre	+/-	+	+
MITI	Respirometri: syreförbrukning	+	+/-	+

Uppgifter om de relativa proportionerna av testmaterialets huvudbeståndsdelar är till nytta vid tolkningen av de erhållna resultaten, särskilt om resultaten är låga eller marginella.

Uppgifter om testkemikaliens toxicitet för bakterier (bilaga IV) kan vara till nytta vid valet av lämpliga testkoncentrationer och vara avgörande vid tolkningen av låga bionedbrytbarhetsvärden.

I.3 REFERENSÄMNEN

För att kontrollera förfarandet används referensämnen som uppfyller kriterierna för lätt bionedbrytbarhet och som testas i en separat kolv parallellt med de övriga proverna.

Anilin (färskt destillerat), natriumacetat och natriumbensoat är lämpliga kemikalier. Alla dessa referenskemikalier bryts ned vid dessa metoder även när inget inokulat tillsätts.

Det har föreslagits att man borde söka efter en referenskemikalie som är lätt nedbrytbar men som kräver tillsättning av inokulat. Kaliumhydrogenftalat har föreslagits men det behövs mer bevis innan detta ämne kan godtas som ett referensämne.

I metoder som baseras på respirometri kan kvävehaltiga föreningar påverka syreupptagningen på grund av nitri-fikation (se bilagor II och V).

I.4 TESTMETODSPRINCIP

Testämnet upplöses eller uppslammas i ett oorganiskt testmedium, inokuleras och inkuberas under aeroba förhållanden i mörker eller diffust ljus. Den del av DOC i lösningen som stammar från inokulat ska vara så lågt som möjligt i jämförelse med den del som stammar från testämnet. Man ska ta hänsyn till inokulatets endogena aktiviteter genom att köra parallella blindprov med inokulat men utan testämne i lösningen, även om cellernas endogena aktivitet under närvaro av ämnet inte exakt motsvarar denna i den endogena kontrollen. Ett referensämne används parallellt för att kontrollera hur förfarandena fungerar.

▼B

I allmänhet följs nedbrytning genom bestämning av parametrar, såsom DOC, CO_2-produktion och syreupptagning, och mätningar görs tillräckligt ofta för att möjliggöra identifiering av början och slutet av bionedbrytningen. Mätningarna görs kontinuerligt med automatiska respirometrer. Under tiden mäts både DOC och en annan parameter, men detta sker normalt endast i början och slutet av testet. Specifika kemiska analyser kan också användas för att bedöma primär nedbrytning av testämnet, och för bestämning av koncentrationen av eventuella mellanprodukter (obligatoriskt i MITI-testet).

Testet vara normalt i 28 dagar. När bionedbrytningskurvan har nått en platå vid minst 3 mätningar kan dock testet avbrytas. Om kurvan visar att bionedbrytning har börjat men ännu inte nått en platå inom 28 dagar kan testet förlängas utöver denna period.

I.5 KVALITETSKRITERIER

I.5.1 **Repeterbarhet**

Till följd av bionedbrytningens natur och den blandade bakteriepopulationen i inokulat, bör minst dubbla bestämningar göras.

Det är en allmän erfarenhet att variationen mellan replikat blir mindre ju större startkoncentrationer av mikroorganismer i testmediet är. Ringtester har dessutom visat att det kan finnas stora variationer mellan resultat som erhållits av olika laboratorier, men generellt uppnås god överensstämmelse med lätt bionedbrytbara föreningar.

I.5.2 **Testets giltighet**

Ett test anses giltigt om skillnaden mellan de två yttersta värdena för testämnets försvinnande vid en multibestämning i platåfasen, vid avslutning av testet eller vid avslutningen av 10-dagarsfönstret är mindre än 20 % och om den procentuella nedbrytbarheten av referensämnet har nått nivån för lätt bionedbrytbarhet inom 14 dagar. Om inte båda villkoren uppfylls upprepas testet. På grund av stringensen i detta test behöver ett lågt resultat inte nödvändigtvis betyda att testämnet inte är bionedbrytbart under miljöbetingelser utan det pekar på att det krävs mer arbete för att fastställa detta.

Om nedbrytningen i ett toxicitetstest med både testämne och referenskemikalie är mindre än 35 % (baserad på DOC) eller 25 % (baserad på ThOD eller $ThCO_2$) inom 14 dagar måste man anta att testämnet är hämmande (se även bilaga 4). Testserien upprepas, om möjligt med lägre testämneskoncentrationer och högre inokulatkoncentration, dock högst 30 mg/fast ämne/liter.

I.6 ALLMÄNNA FÖRFARANDEN OCH FÖRBEREDELSER

Allmänna villkor som gäller för testerna sammanfattas i tabell 2. Apparatur och andra försöksbetingelser som gäller specifikt för ett individuellt test beskrivs senare under rubriken för det testet.

▼B

Tabell 2

Testbetingelser

Test	DOC- elimine-ring	CO_2-utveckling	Manometrisk respirometri	Modifierad OECD screening	Closed bottle	MITI(I)
Koncentration av testämnet						
som mg/l			100		2–10	100
mg/DOC/l	10–40	10–20		10–40		
mg/ThOD/l			50–100		5–10	
Koncentration av inokulat (i celler/l, cirka)	≤ 30 mg/l SS eller ≤ 100 ml utflöde/l (10^7–10^8)			0,5 ml sekundärt utflöde/l ($I0^5$)	≤ 5 ml av utflöde/l (10^4–10^6)	30 mg/l SS (10^7–10^8)
Koncentration av element i mineralmedium (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-värde	7,4±0,2					helst 7,0
Temperatur	22 ± 2 °C					25 ±1 °C

DOC = Upplöst organiskt kol ThOD = Teoretiskt syrebehov SS = Suspenderat fast ämne

I.6.1 **Utspädningsvatten**

Avjoniserat eller destillerat vatten utan innehåll av toxiska substanser (t.ex. Cu^{++} joner) används. Det får inte innehålla mer än 10 % av det organiska kol som tillförs med testämnet. Denna höga renhet är nödvändig för att undvika höga blindvärden. Föroreningar kan stamma från naturliga orenheter och från jonbyteshartser och material från bakterier och alger. Till en testserie får endast vatten från samma behållare användas och detta vatten ska kontrolleras i förväg genom DOC-analys. En sådan kontroll är inte nödvändig för Closed Bottle-test, men syreförbrukningen från vattnet ska vara låg.

▼B

I.6.2 **Stamlösningar av oorganiska medier**

Stamlösningar framställs av oorganiska medier med passande koncentrationer av salt för användning vid framställning av testlösningarna. Följande stamlösningar kan (med olika förtunningsförhållanden) användas för DOC-eliminering, modifierad OECD-screening, CO_2-utveckling, manometrisk respirometri och Closed Bottle-test.

Stamlösningar:

a) Monokaliumdiväteortofosfat, KH_2PO_4 8,50 g

Dikaliumväteortofosfat, K_2HPO_4 21,75 g

Dinatriumväteortofosfat-dihydrat, $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ 33,40 g

Ammoniumklorid, NH_4Cl 0,50 g

Upplöses i vatten så att 1 000 ml erhålls. pH-värdet ska vara 7,4.

b) Kalciumklorid $CaCl_2$ 27,50 g

eller kalciumklorid, dihydrat, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 36,40 g

Upplöses i vatten så att 1 000 ml erhålls

c) Magnesiumsulfat-heptahydrat, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 22,50 g

Upplöses i vatten så att 1 000 ml erhålls

d) Järn(III)klorid-hexahydrat $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 0,25 g

Upplöses i vatten så att 1 000 ml erhålls (1.6.1.1).

Kommentar: För att undvika att behöva framställa denna lösning omedelbart före användning tillsätts 1 droppe koncentrerat HC1 eller 0,40 g etylendiaminotetraättiksyra (EDTA) per liter.

I.6.3 **Stamlösningar av kemikalier**

Om lösligheten är större än 1 g/l upplöses t.ex. 1–10 g av test- eller referenskemikalien i avjoniserat vatten, och det förtunnas till 1 liter. I motsatt fall framställs stamlösningen i det oorganiska mediet, eller kemikalier tillsätts direkt till det oorganiska mediet. Jämför tillägg III för hantering av mindre lösliga kemikalier. I MITI-testet (metod C.4-F) får dock varken lösningsmedel eller emulgatorer användas.

▼B

I.6.4 **Inokulat**

Inokulat kan stamma från en rad olika källor, t.ex. aktivt slam, spillvattensavlopp (ej klorerat), ytvvatten och ytjord eller en blandning av dessa. Aktivt slam för DOC-eliminering, CO_2-utveckling och manometrisk respirometri ska tas från ett reningsverk eller ett laboratorium, som huvudsakligen behandlar avloppsvatten från hushåll. Inokulat från andra källor har visat sig leda till större spridning av resultaten. För modifierad OECD-screening och Closed Bottle-testet krävs ett mer utspätt inokulat utan slampartiklar, och som källa föredras sekundärt avloppsvatten från ett reningsverk som behandlar avloppsvatten från hushåll eller en anläggning i laboratorieskala. För MITI-testet framställs inokulat från en blandning av källor, vilket beskrivs under detta specifika test.

I.6.4.1 *Inokulat från aktiverat slam*

Ett färskt prov av aktiverat slam tas från en luftningsbassäng vid ett reningsverk eller en laboratorieanläggning som huvudsakligen behandlar avloppsvatten från hushåll. Vid behov avlägsnas grova partiklar genom filtrering genom en finmaskigt sikt och slammet hålls därefter aerobt.

Alternativt utfälls eller centrifugeras slammet (t.ex. vid 1 100 g i 10 minuter) sedan grova partiklar tagits bort. Supernatanten avlägsnas. Slammet kan tvättas i oorganiskt medium. Det koncentrerade slammet uppslammas till en koncentration av 3–5 g uppslammat torrämne per liter, varefter det luftas fram till användning.

Slammet ska tas från en ordentligt fungerande normal anläggning. Om det är nödvändigt att ta slammet från ett starkt belastat reningsverk, eller om man anser att det innehåller hämmande ämnen, måste det tvättas. Utfäll eller centrifugera det omsuspenderade slammet efter noggrann blandning, avlägsna supernatanten och slamma återigen upp det tvättade slammet i en ytterligare mängd oorganiskt medium.

Strax före användning tas ett prov av det fullständigt uppslammade slammet eller av det obehandlade slammet, för bestämning av mängden uppslammat torrämne.

Ett annat alternativ är att homogenisera aktiverat slam (3–5 g uppslammat torrämne per liter). Slammet behandlas i en mekanisk blandare i 2 minuter vid medelhastighet. Det homogeniserade slammet får utfälla i 30 minuter eller vid behov längre, och vätskan dekanteras för användning som inokulat i en mängd av 10 ml per liter oorganiskt medium.

I.6.4.2 *Andra inokulatkällor*

Det kan framställas av sekundärt avloppsvatten från ett reningsverk eller en laboratorieanläggning som huvudsakligen behandlar avloppsvatten från hushåll. Ett färskt prov tas och förvaras under aerobiska förhållanden under transporten. Detta får utfälla i 1 timma eller filtreras genom ett grovt filterpapper och denna vätska förvaras under aeroba förhållanden fram till användning. Upp till 100 ml av detta slags inokulat kan användas per liter medium.

▼B

Ytvatten är en ytterligare inokulatkälla. I detta fall tas ett prov av lämpligt ytvatten, t.ex. flod- eller sötvatten, som förvaras under aeroba förhållanden fram till användning. Vid behov kan inokulat koncentreras genom filtrering eller centrifugering.

I.6.5 **Förbehandling av inokulat**

Det framställda inokulatet kan förbehandlas till försöksbetingelserna, men får inte tillvänjas till testkemikalien. Förbehandlingen består i luftning av aktivt slam i oorganiskt medium eller av sekundärt avloppsvatten i 5–7 dagar vid rumstemperatur. Förbehandling för MITI-test anses onödigt.

I.6.6 **Abiotisk kontroll**

Vid behov kontrolleras eventuell abiotisk nedbrytning av testämnet genom bestämning av DOC-förlust, syreupptagning och koldioxidutveckling i sterila kontrollprover som inte innehåller okulat. Sterilisering sker genom membranfiltrering (0,2–0,45 um) eller genom tillsättning av ett passande toxiskt ämne i passande koncentration. Om membranfiltrering används ska proverna tas aseptiskt för att upprätthålla steriliteten. Såvida inte adsorption av testämnet har uteslutits på förhand ska test som mäter bionedbrytning som DOC-förlust inkludera en abiotisk kontroll som inokuleras och förgiftas. Detta gäller särskilt för inokulat med aktiverat slam.

I.6.7 **Antal kolvar**

För varje test beskrivs antalet kolvar i en typisk försöksserie under rubriken för varje test.

Följande kolvtyper kan användas:

— Testuppslamning: innehåller testämne och inokulat.

— Inokulatblind: innehåller endast inokulat.

— Förfarandekontroll: innehåller referensämne och inokulat.

— Abiotisk steril kontroll: sterilt, innehåller testämne (1.6.6).

— Adsorptionskontroll: innehåller testämne, inokulat och steriliserat ämne.

— Toxicitetskontroll: innehåller testämne, referensämne och inokulat.

Bestämningar i testuppslamningen och inokulatblind ska obligatoriskt göras parallellt. Dessutom rekommenderas parallella bestämningar i den andra kolven.

Detta är dock inte alltid möjligt. Man måste se till att tillräckligt många prover tas eller att tillräckligt många avläsningar görs för att kunna värdera den procentuella elimineringen i 10-dagarsfönstret.

▼B

1.7 DATA OCH UTVÄRDERING

Vid beräkning av den procentuella nedbrytningen D_t används genomsnittsvärdena av de dubbla bestämningarna av parametern i testuppslamningen och inokulatblindproven. Formlerna ges i avsnitten om de enskilda testmetoderna. Nedbrytningens förlopp visas grafiskt med angivelse av 10-dagarsfönstret. Den procentuella elimineringen vid avslutningen av 10-dagarsfönstret och vid platån eller testets avslutning beräknas och rapporteras.

I metoder som baseras på respirometri kan kvävehaltiga föreningar påverka syreupptagningen på grund av nitrifikation (se bilagor II och V).

I.7.1 **Nedbrytning mätt genom DOC-bestämning**

Den procentuella nedbrytningen (D_t) vid varje provtagningstillfälle ska beräknas särskilt för kolvarna som innehåller testämne varvid genomsnittsvärdena av de dubbla bestämningarna av DOC används för att kunna bedöma testets pålitlighet (se 1.5.2). Den beräknas genom användning av följande formel:

$$D_t = \left(1 - \frac{C_t - C_{bt}}{C_o - C_{b0}}\right) \times 100$$

där:

D_t = % nedbrytning vid tidpunkten t

C_o = genomsnittlig startkoncentration av DOC i kulturmediet med testämne och inokulat (mg DOC/l)

C_t = genomsnittskoncentrationen av DOC i kulturmediet med oorganiskt medium och inokulat mg DOC/l)

C_{bo} = genomsnittlig startkoncentration av DOC i blindprov med oorganiskt medium och inokulat (mg DOC/1)

C_{bt} = genomsnittskoncentration av DOC i blindprov med oorganiskt medium och inokulat vid tidpunkten t (mg DOC/1)

Alla koncentrationer bestäms experimentellt.

I.7.2 **Nedbrytning mätt genom specifik analys**

Om specifika analysdata föreligger beräknas den primära bionedbrytningen genom formeln

$$D_t = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

där:

D_t = % nedbrytning vid tidpunkten t, normalt 28 dagar

S_a = restmängd testämne i medium med inokulat vid testets avslutning (mg)

S_b = restmängd testämne i blindprov endast med vatten/medium och testämne (mg)

▼B

I.7.3 **Abiotisk nedbrytning**

När abiotisk nedbrytning används beräknas den procentuella abiotiska nedbrytningen med användning av

$$\% \text{ abiotic degradation} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

där:

$C_{s(o)}$ = DOC-koncentration, sterilkontrollen på dag 0

$C_{s(t)}$ = DOC-koncentration, sterilkontrollen på dag t.

I.8 RAPPORTERING

Testrapporten ska om möjligt innehålla följande:

— Test- och referenskemikalie och deras renhet.

— Testbetingelser.

— Inokulat: art och provtagningsställe, koncentration och eventuell förbehandling.

— Art och andel av industriavloppsvatten i avloppsvattnet, om känt.

— Testets varaktighet och temperatur.

— I fråga om svårlösliga testkemikalier: genomförd behandling.

— Använd testmetod; ändringar av förfarandet ska vara vetenskapligt motiverat.

— Försöksresultaten uppställda i tabellform.

— Eventuellt observerade hämningsfenomen.

— Eventuellt observerad abiotisk nedbrytning.

— Eventuella data från specifika kemiska analyser.

— Om möjligt analytiska data om nedbrytningsprodukter.

— Avbildning av den procentuella nedbrytningen mot tiden för både test- och referensämnen med tydlig angivelse av ”lag”-fas, nedbrytningstid, 10-dagarsfönster och lutning (se bilaga I). Om man i testet använder pålitlighetskriterier kan genomsnittet av nedbrytningsprocenten i kolvarna innehållande testämnet användas för framställning av grafen.

— Procentuell eliminering efter 10-dagarsfönstret och vid platån eller testets avslutning.

DEL II. **DOC-ELIMINERING (DOC DIE-AWAY)** (Metod C.4-A)

II.1 TESTMETODSPRINCIP

En uppmätt mängd oorganiskt medium innehållande inokulat och, som nominella enda organiska kolkälla, testämne av känd koncentration (10–40 mg/l), luftas i mörker eller diffust ljus vid 22 ± 2 °C.

▼B

Nedbrytningen följs genom regelbunden DOC-analys i 28 dagar. Bionedbrytningen beräknas genom att uttrycka koncentrationen av avlägsnat DOC (korrigerat för koncentration i inokulatblindprovet) i procent av startkoncentrationen av DOC. Den primära bionedbrytningen kan också beräknas utifrån kompletterande kemisk analys vid inkubationsperiodens början och slut.

II.2 METODBESKRIVNING

II.2.1 **Apparatur**

a) Koniska kolvar, t.ex. från 250 ml till 2 liter, beroende på den volym som krävs för DOC-analysen.

b) Skakapparatur för de koniska kolvarna, antingen med automatisk temperaturkontroll eller placerad i en lokal med konstant temperatur, och tillräckligt kraftig för att hålla förhållandena aeroba i alla kolvarna.

c) Filtreringsapparatur med passande membran.

d) DOC-analysator.

e) Apparatur för bestämning av upplöst syre.

f) Centrifug.

II.2.2 **Framställning av oorganiskt medium**

Se 1.6.2 om framställning av stamlösning.

10 ml av lösningen (a) blanda med 800 ml utspädningsvatten, och av lösning (b), (c) och (d) tillsätts 1 ml av varje, varefter det fylls upp till 1 liter med förtunningsvatten.

II.2.3 **Framställning och förbehandling av inokulat**

Inokulat kan stamma från en rad olika källor: aktiverat slam, avloppsvatten, ytvatten och ytjord eller en blandning av dessa.

Se 1.6.4, 1.6.4.1, 1.6.4.2 och 1.6.5.

II.2.4 **Förberedelse av kolvarna**

Som ett exempel kan 800 ml portioner av oorganiskt medium överföras till koniska 2-literskolvar, varefter det tillsätts så mycket av stamlösningarna av test- och referensämne till de olika kolvarna att kemikaliekoncentrationen blir 10–40 mg DOC per liter. Kontrollera pH-värden och justera om nödvändigt till 7,4. Inokulat från aktiverat slam eller en annan källa tillsätts (se I.6.4) till en slutkoncentration av högst 30 mg uppslammat torrämne per liter. Inokulatprover förbereds också i oorganiskt medium utan test- och referenskemikalier.

Vid behov inkluderas även en kolv för kontroll av om testkemikalien har en hämmande verkan, genom tillsättning av jämförbart lika stora mängder test- och referenskemikalie till oorganiskt medium innehållande inokulat.

Man kan också vid behov inkludera en steril kolv, dvs. en kolv utan inokulat för att undersöka om testkemikalien bryts ned abiotiskt (se 1.6.6).

▼B

Om man misstanker att testkemikalien i väsentlig grad kan adsorberas till gas, slampartiklar eller liknande, företas dessutom en preliminär värdering av denna adsorption och därmed av testens lämplighet för den berörda testkemikalien (se tabell 1). Använd en kolv innehållande testämnet, inokulat och det steriliserande ämnet.

Alla kolvar fylls upp till 1 liter med oorganiskt medium, och efter blandning uttas ett prov från varje kolv för bestämning av startkoncentrationen av DOC (se bilaga II, punkt 4). Kolvarnas öppning sluts, t.ex. med aluminiumfolie, på ett sådant sätt att luften fritt kan passera in och ut ur kolvarna. Därefter inleds testet genom att kolvarna placeras i skakapparaturen.

II.2.5 **Antal kolvar i en typisk testserie**

Kolv 1 och 2: testuppslamning

Kolv 3 och 4: inokulatblind

Kolv 5: förfarandekontroll

Rekommenderas vid behov:

Kolv 6: abiotisk steril kontroll

Kolv 7: adsorptionskontroll

Kolv 8: toxicitetskontroll

Se I.6.7.

II.2.6 **Utförande av testet**

Under testet görs dubbla bestämningar av DOC-koncentrationerna i alla kolvarna med bestämda tidsintervaller och så ofta att både 10-dagarsfönstret och den procentuella förlusten vid 10-dagarsfönstrets avslutning kan konstateras. Endast så mycket av testuppslamningen tas som är nödvändigt för analysen.

Före provtagningen kompenseras för eventuell förångningsförlust från kolvarna genom tillsättning av vatten (1.6.1). Innan proven tas blandas kulturmediet noggrant och det säkerställs att materialet på kolvens sidor löses upp eller uppslammas före provtagning. Omedelbart efter provtagningen membran-filtreras eller centrifugeras provet (se tillägg 4). Det filtrerade eller centrifugerade provet analyseras samma dag. Det kan förvaras i högst 48 timmar vid 2–4 ^{o}C eller längre vid högst – 18 ^{o}C.

II.3 DATA OCH RAPPORTERING

II.3.1 **Behandling av resultaten**

Den procentuella nedbrytningen vid tidpunkt t beräknas enligt 1.7.1 (DOC-bestämning) och eventuellt enligt 1.7.2 (specifik analys).

Alla resultat antecknas på tillhörande scheman.

▼B

II.3.2 **Resultatens giltighet**

Se I.5.2.

II.3.3 **Rapportering**

Se I.8.

II.4 FORMULÄR

Nedanför visas ett exempel på ett resultatschema.

DOC-ELIMINERING

1. **LABORATORIUM**

2. **DATUM VID INLEDNING AV TEST**

3. **TESTÄMNE**

Namn:

Stamlösningens koncentration: .... mg/l ämne

Startkoncentration i mediet: t_0: .... mg/l ämne

4. **INOKULAT**

Källa:

Behandling:

Eventuell förbehandling:

Koncentration av uppslammat torrämne i reaktionsblandningen: ... mg/l:

5. **KOLBESTÄMNINGAR**

Kolanalyser:

	Kolv nr		DOC efter n dagar (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Testkemikalien med inokulat	1	a_1					
		a_2					
		a, medel $C_{a(t)}$					
	2	b_1					
		b_2					
		b, medel $C_{b(t)}$					

▼B

	Kolv nr		DOC efter n dagar (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Inokulatblindprovet utan testkemikalie	3	c_1					
		c_2					
		c, medel $C_{c(t)}$					
	4	d_1					
		d_2					
		d, medel $C_{d(t)}$					
	$C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. **UTVÄRDERING AV RÅDATA**

Kolv nr.		% nedbrytning efter n dagar				
		Q	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				
medel (*)	$D = \frac{D_1 - D_2}{2}$	0				

(*) Genomsnittet av D, och D_2 ska inte tas om det är en betydande skillnad.

Anmärkning: Motsvarande formler kan användas för referenskemikalien och toxicitetskontrollproverna.

7. **ABIOTISK KONTROLL (valfritt)**

	Tid (dagar)	
	0	t
DOC-koncentration (mg/l) i sterilkontroll	$C_{s(0)}$	$C_{s(t)}$

$$\% \text{ abiotic degradation} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

8. **SPECIFIK KEMISK ANALYS (valfritt)**

	Restmängd av testämne vid avslutning av test (mg/l)	% primär nedbrytning
Sterilkontroll	s_b	

▼B

	Restmängd av testämne vid avslutning av test (mg/l)	% primär nedbrytning
Inokulerat testmedium	s_a	$\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$

DEL III. **MODIFIERAT OECD-SCREEENINGTEST** (metod C.4-B)

III.1 TESTMETODSPRINCIP

En uppmätt mängd oorganiskt medium innehållande inokulat och, som nominella enda organiska kolkälla, testämne av känd koncentration (10–40 mg/l), luftas i mörker eller diffust ljus vid 22 ± 2 °C.

Nedbrytningen följs genom regelbunden DOC-analys i 28 dagar. Bionedbrytningen beräknas genom att uttrycka koncentrationen av avlägsnat DOC (korrigerat för koncentration i inokulatblindprovet) i procent av startkoncentrationen av DOC. Den primära bionedbrytningen kan också beräknas utifrån kompletterande kemisk analys vid inkubationsperiodens början och slut.

III.2 METODBESKRIVNING

III.2.1 Apparatur

a) Koniska kolvar, t.ex. från 250 ml till 2 liter, beroende på den volym som krävs för DOC-analysen.

b) Skakapparatur för de koniska kolvarna, antingen med automatisk temperaturkontroll eller placerad i en lokal med konstant temperatur, och tillräckligt kraftig för att hålla förhållandena aeroba i alla kolvarna.

c) Filtreringsapparatur med passande membran.

d) DOC-analysator.

e) Apparatur för bestämning av upplöst syre.

f) Centrifug.

III.2.2 **Framställning av oorganiskt medium**

Se I.6.2 om framställning av stamlösning.

10 ml av lösningen (a) blandas med 80 ml utspädningsvatten, och av lösning (b), (c) och (d) tillsätts 1 ml av varje, varefter det fylls upp till 1 liter med förtunningsvatten.

I denna metod används endast 0,5 liter spillvatten per liter som inokulat, och därför kan det vara nödvändigt att tillsätta ytterligare spårämnen och växtfaktorer till mediet. Detta görs genom tillsättning av 1 ml av var och en av följande lösningar per liter medium (slutvolymen):

▼B

Lösningar av spårämnen:

Mangansulfat tetrahydrat, $MnSO_4 . 4H_2O$	39,9 mg
Borsyra, H_3BO_3	57,2 mg
Zinksulfat heptahydrat, $ZnSO_4 .7H_2O$	42,8 mg
Ammoniumheptamolybdat $(NH_4)_6M0_7O_{24}$	34,7 mg
Järn-chelat ($FeCl_3$ etylendiamintetraättiksyra)	100,0 mg

löses i vatten och förtunnas till 1 000 ml

Vitaminlösning:

Jästextrakt	15,0 mg

löses i 100 ml vatten. Det steriliseras genom filtrering genom 0,2 μm membranfilter om lösningen framställs färsk varje gång.

III.2.3 **Framställning och förbehandling av inokulat**

Inokulat kan stamma från en rad olika källor: aktiverat slam, avloppsvatten, ytvatten och ytjord eller en blandning av dessa. Se 1.6.4.2 och 1.6.5.

0,5 ml per liter oorganisk lösning används.

III.2.4 **Förberedelse av kolvarna**

Som ett exempel kan 800 ml portioner av oorganiskt medium överföras till koniska 2-literskolvar, varefter det tillsätts så mycket av stamlösningarna av test- och referensämne till de olika kolvarna att kemikaliekoncentrationen blir 10–40 mg DOC per liter. Kontrollera pH-värden och justera till 7,4 om nödvändigt. 0,5 ml spillvatten tillsätts per liter (se I.6.4.2) till kolvarna som inokulat. Inokulatprover förbereds också i oorganiskt medium utan test- och referenskemikalier.

Vid behov inkluderas även en kolv för kontroll av om testkemikalien har en hämmande verkan, genom tillsättning av jämförbart lika stora mängder test- och referenskemikalie till oorganiskt medium innehållande inokulat.

Man kan också vid behov inkludera en steril kolv, dvs. en kolv utan inokulat för att undersöka om testkemika-lien bryts ned abiotiskt (se 1.6.6).

Om man misstänker att testkemikalien i väsentlig grad kan adsorberas till gas, slampartiklar eller liknande, företas dessutom en preliminär värdering av denna adsorption och därmed av testens lämplighet för den berörda testkemikalien (se tabell 1). Använd en kolv innehållande testämnet, inokulat och det steriliserande ämnet.

Alla kolvar fylls upp till 1 liter med oorganiskt medium, och efter blandning uttas ett prov från varje kolv för bestämning av startkoncentrationen av DOC (se bilaga II, punkt 4). Kolvarnas öppning sluts, t.ex. med aluminiumfolie, på ett sådant sätt att luften fritt kan passera in och ut ur kolvarna. Därefter inleds testet genom att kolvarna placeras i skakapparaturen.

▼B

III.2.5 **Antal kolvar i en typisk testserie**

Kolv 1 och 2: testuppslamning

Kolv 3 och 4: inokulatblind

Kolv 5: förfarandekontroll

Rekommenderas vid behov:

Kolv 6: abiotisk steril kontroll

Kolv 7: adsorptionskontroll

Kolv 8: toxicitetskontroll

Se I.6.7.

III.2.6 **Utförande av testet**

Under testet görs dubbla bestämningar av DOC-koncentrationerna i alla kolvarna med bestämda tidsintervaller och så ofta att både 10-dagarsfönstret och den procentuella förlusten vid 10-dagarsfönstrets avslutning kan konstateras. Endast så mycket av testuppslamningen tas som är nödvändigt för analysen.

Före provtagningen kompenseras för eventuell förångningsförlust från kolvarna genom tillsättning av förtunningsvatten (I.6.1). Innan proven tas blandas kulturmediet noggrant och det säkerställs att materialet på kolvens sidor löses upp eller uppslammas innan provtagning. Omedelbart efter provtagningen membranfiltreras eller centrifugeras provet (se tillägg 4). Det filtrerade eller centrifugerade provet analyseras samma dag. Det kan förvaras i högst 48 timmar vid 2–4 ^{o}C eller längre vid högst – 18 ^{o}C.

III.3 DATA OCH RAPPORTERING

III.3.1 **Behandling av resultaten**

Den procentuella nedbrytningen vid tidpunkt t beräknas enligt 1.7.1 (DOC-bestämning) och eventuellt enligt 1.7.2 (specifik analys).

Alla resultat antecknas på tillhörande scheman.

III.3.2 Resultatens giltighet

Se. I.5.2.

III.3.3 Rapportering

Se I.8.

III.4 FORMULÄR

Nedan visas ett exempel på ett formulär.

MODIFIERAT OECD-SCREENINGTEST

1. **LABORATORIUM**

2. **DATUM VID INLEDNING AV TEST**

▼B

3. **TESTÄMNE**

Namn:

Stamlösningens koncentration: .... mg/l ämne

Startkoncentration i mediet, till: .... mg/l ämne

4. **INOKULAT**

Källa:

Behandling:

Eventuell förbehandling:

Koncentration av uppslammat torrämnen i reaktionsblandningen:
... mg/l

5. **KOLBESTÄMNINGAR**

Kolanalyser:

	Kolv nr		DOC efter n dagar (mg/l)				
			0	N_1	n_2	n_3	n_x
Testkemikalie med inokulat	1	a_1					
		a_2					
		a, medel $C_{a(t)}$					
	2	b_1					
		b_2					
		b, medel $C_{b(t)}$					
Inokulatblindprov utan testkemikalie	3	c_1					
		c_2					
		c, medel $C_{c(t)}$					
	4	d_1					
		d_2					
		d, medel $C_{d(t)}$					
	$C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. **UTVÄRDERING AV RÅDATA**

Kolv nr		% nedbrytning efter n dagar				
		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

Kolv nr		% nedbrytning efter n dagar				
		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				
medel (*)	$D = \frac{D_1 - D_2}{2}$	0				

(*) Genomsnittet av D_1 och D_2 ska inte tas om det är en betydande skillnad.

Anmärkning: Motsvarande formler kan användas för referenskemikalie och toxicitetskontrollproverna.

7. **ABIOTISK KONTROLL** (valfritt)

	Tid (dagar)	
	0	t
DOC-koncentration (mg/l) i sterilkontroll	$C_{s(0)}$	$C_{s(t)}$

$$\% \text{ abiotic degradation} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

8. **SPECIFIK KEMISK ANALYS** (valfritt)

	Restmängd av testämne vid avslutning av test (mg/I)	% primär nedbrytning
Sterilkontroll	s_b	
Inokulerat testmedium	s_a	$\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$

DEL IV. CO_2-UTVECKLING (metod C.4-C)

IV.1 TESTMETODSPRINCIP

En uppmätt mängd oorganiskt medium innehållande inokulat och, som nominella enda organiska kolkälla, testämne av känd koncentration (10–40 mg DOC eller TOC/l), luftas genom genomledning av koldioxidfri luft med kontrollerad hastighet i mörker eller diffust ljus. Nedbrytningen följs i 28 dagar genom bestämning av den bildade mängden koldioxid i det att det samlas upp i barium- eller natriumhydroxid och mäts antingen genom titrering av resterade hydroxid eller som oorganiskt kol. Den mängd koldioxid som utvecklats av testkemikalien (korrigerat för inokulatblindvärden) uttrycks i procent av startkoncentrationen av $ThCO_2$. Graden av bionedbrytning kan också beräknas utifrån kompletterande DOC-analyser vid inkubationsperiodens början och slut.

▼B

IV.2 METODBESKRIVNING

IV.2.1 **Apparatur**

a) Kolvar 2–5 liter, alla försedda med luftningsrör, som nästan når ned till botten av behållaren, och avgångsöppning.

b) Magnetomrörare, när svårlösliga kemikalier testas.

c) Gasabsorptionskolvar.

d) Utrustning för kontroll och mätning av luftgenomströmningen.

e) Apparatur för tvättning av koldioxid, för framställning av koldioxidfri luft. Alternativt kan CO_2-fri syre och CO_2-fritt kväve användas i stålkolvar i det riktiga blandningsförhållandet (20 % O_2 och 80 % N_2).

f) Utrustning för bestämning av koldioxid, antingen trimetriskt eller genom en annan form av analys för oorganiskt kol.

g) Membranfiltreringsapparatur (valfritt).

h) DOC-analysator (valfritt).

IV.2.2 **Framställning av oorganiskt medium**

Se 1.6.2 om framställning av stamlösning.

10 ml av lösningen (a) blandas med 800 ml utspädningsvatten, och av lösning (b), (c) och (d) tillsätts 1 ml av varje, varefter det fylls upp till 1 liter med förtunningsvatten.

IV.2.3 **Framställning och förbehandling av inokulat**

Inokulat kan stamma från en rad olika källor: aktiverat slam, avloppsvatten, ytvatten och ytjord eller en blandning av dessa.

Se I.6.4, I.6.4.1, I.6.4.2 och I.6.5.

IV.2.4 **Förberedelse av kolvarna**

Följande volym- och viktangivelser gäller som exempel för 5-literskolvar med 3 l uppslamning. Om mindre volymer används anpassas värdena, dock ska den bildade mängden koldioxid kunna bestämmas korrekt.

2 400 ml oorganiskt medium överförs till varje 5-literskolv. Man tillsätter så mycket förberett aktiverat slam (se I.6.4.1 och I.6.5) att koncentrationen av uppslammat torrämne blir högst 30 mg/l i 3 liter slutblandning. Alternativt kan det förberedda slammet först förtunnas med oorganiskt medium till en uppslamning innehållande 500–1 000 mg/l, varefter en det av detta tillsätts till 5-literkolvens innehåll till en koncentration av 30 mg/l. Detta ger större precision. Andra inokulatkällor kan användas (se I.6.4.2).

Dessa blandningar luftas över natten med CO_2-fri luft så all koldioxid drivs ut ur systemet.

▼B

Test- och referensämne tillsätts var för sig som kända mängder av stamlösningar till replikatkolvarna så att man uppnår en koncentration av 10–20 mg DOC eller TOC per liter. Till vissa av kolvarna tillsätts inga kemikalier och dessa fungerar som inokulatkontrollprover. Svårlösliga testämnen tillsätts direkt till kolvarna på vikt- eller volyrnbasis, eller hanteras i enlighet med bilaga III.

Om det är nödvändigt används en kolv för att kontrollera om testkemikalien verkar hämmande. Detta görs genom att tillsätta både test- och referenskemikalie av samma koncentration som i de andra kolvarna.

Det kan vara nödvändigt att inkludera en steril kolv, dvs. en kolv utan inokulat för att undersöka om testkemikalien bryts ned abiotiskt (se 1.6.6). Sterilisera genom tillsättning av ett giftigt ämne i passande koncentration.

Alla kolvarna fylls upp till en uppslamningsvolym av 3 liter genom tillsättning av oorganiskt medium, som i förväg har genomluftats med CO_2-fri luft. Eventuellt kan man ta prover för DOC-analys (se bilaga II.4) och specifik analys. Absorptionskolvarna förbinds till kolvarnas avgångsöppning.

Om banumhydroxid används ansluts de 3 absorptionskolvarna, var och en innehållande 100 ml 0,0125 M bariumhydroxidlösning, i en serie till varje 5-literskolv. Lösningen ska vara fri från fällt sulfat och karbonat och dess styrka ska bestämmas omedelbart före användning. Om natriumhydroxid används ansluts 2 kolvar varvid den sista fungerar som kontroll av att koldioxiden är absorberad i den första. Absorptionskolvar med serum-kolvstängning är lämpliga. 200 ml 0,05 natriumhydroxid placeras i varje kolv, vilket är tillräckligt för att absorbera hela den mängd koldioxid som utvecklas när testkemikalien bryts ned fullständigt. Natriumhydroxidlösning kommer, även om färskt framställd, dock att innehålla spår av karbonat. Detta korrigeras genom subtraktion av blindprovens karbonatinnehåll.

IV.2.5 **Antal kolvar i en typisk testserie**

Kolv 1 och 2: testuppslamning

Kolv 3 och 4: inokulatblind

Kolv 5: förfarandekontroll

Rekommenderas vid behov:

Kolv 6: abiotisk steril kontroll

Kolv 7: adsorptionskontroll

Kolv 8: toxicitetskontroll

Se I.6.7.

IV.2.6 **Utförande av testet**

Testet inleds genom genombubbling av uppslamningarna med 30–100 ml CO_2-fri luft per minut. Prover tas regelbundet av kodioxidabsorbenten för analys av CO_2-innehåll. Det rekommenderas att man under de första 10 dagarna gör analyser varannan eller var tredje dag och därefter var femte dag fram till dag 28, så att 10-dagarsfönstret kan identifieras.

▼B

Den 28:e dagen tas (eventuellt) prover för DOC-analys och specifik analys, uppslamningarnas pH mäts och 1 ml koncentrerad saltsyra tillsätts till varje kolv. Kolvarna luftas över natten så att all koldioxid drivs ut av testuppslamningarna. Dag 29 företas den sista analysen av utvecklad koldioxid.

De dagar då CO_2 bestäms avlägsnas den bariumhydroxidabsorbtionskolv som är närmast kolven och innehåller titreras med 0,05 M HCl med fenoftalein som indikator. De övriga absorbtionskolvarna flyttas fram en plats närmare kolven och en ny kolv innehållande 100 ml färskt framställt 0,0125 M bariumhydroxid placeras längst bak i serien. Titreringarna görs enligt behov, t.ex. när betydande fällning syns i den första kolven men inget syns i den andra, dock minst en gång i månaden. Om NaOH används om absorbtionsmedel tas med en injektionsspruta ett litet prov (beroende på den använda kolämnesanaiysatorn) av natriumhydroxidlösningen i den kolv som är närmast kolven. Provet sprutas in i IC-delen av kolämnesanalysatorn för direkt analys av den utvecklade koldioxiden.

Innehållet i den andra absorbtionskolven analyseras först vid testets avslutning så att man kan korrigera för eventuell överföring av koldioxid

IV.3 DATA OCH RAPPORTERING

IV.3.1 **Behandling av resultaten**

Den absorberade CO_2-mängden är efter titrering given genom

$$mgCO_2 = (100 \times C_B\text{-}0{,}5 \times V \times C_A) \times 44$$

där:

V = den mängd HCl som förbrukas vid titrering av de 100 ml absorptionsmedel (ml)

C_B = bariumhydroxidlösningens koncentration (M)

C_A = saltsyreupplösningens koncentration (M)

Om C_B = 0,0125 M och C_A = 0,05 M ska man använda 50 ml för titrering av 100 ml bariumhydroxid, och CO_2-mängden är given genom:

$$\frac{0{,}05}{2} \times 44 \times \text{ml HCI titrated} = \times \text{ml HCI}$$

I detta fall ska man alltså använda en faktor på 1,1 vid omräkning av den volym HCl som går åt vid titrering, till det antal mg Cl_2 som utvecklats.

Den viktmängd CO_2 som bildas av bara inokulat och av inokulat med testkemikalie, beräknas utifrån de gällande titreringsvärdena, och skillnaden är den viktmängd CO_2 som endast testkemikalien utvecklar.

Om t.ex. enbart inokulat kräver 48 ml för titrering och inokulat plus testkemikalie kräver 45 ml fås

CO_2 från inokulat = 1,1 × (50.48) = 2,2 mg

▼B

CO_2 från inokulat plus testkemikalie = 1,1 × (50-45) = 5,5 mg,

och den viktmängd CO_2 som testkemikalien har utvecklat blir alltså 3,3 mg.

Den procentuella bionedbrytningen beräknas genom

$$\% \text{ nedbrytning} = \frac{\text{mg } CO_2 \text{ utvecklat} \times 100}{ThCO_2 \times \text{mg tillsatt testkemikalie}},$$

eller

$$\% \text{ nedbrytning} = \frac{\text{mg } CO_2 \text{ utvecklat} \times 100}{\text{mg tillsatt TOC i testet} \times 3{,}67}$$

varvid 3,67 är omräkningsfaktorn (44/12) från kol till koldioxid.

Den procentuella nedbrytningen efter en viss tid beräknas genom att lägga ihop de enskilda procentdelarna av $ThCO_2$ som är uppmätta fram till den gällande tidpunkten.

Om natriumhydroxid används som absorptionsmedel beräknas den utvecklade CO_2-mängden, uttryckt som IC (mg), genom att multiplicera absorbtionsmedlets IC-koncentration med dess volym.

Den procentuella nedbrytningen beräknas genom

$$\% \text{ of } ThCO_2 = \frac{\text{mg IC i testkolv} - \text{mg IC i blindprov}}{\text{mg TOC tillsatt som testkemikalie}} \times 100$$

IV.3.2 **Resultatens giltighet**

IC-innehållet i testkemikalieuppslamningen i oorganiskt medium vid testets inledning ska vara mindre än 5 % av TC, och den utvecklade CO_2-mängden i inokulatblindprovet får vid testets avslutning inte överstiga 40 mg per liter medium. Om det finns värden på över 70 mg CO_2 per liter granskas data och försökstekniker noggrant.

Se också I.5.2.

IV.3.3 **Rapportering**

Se I.8.

IV.4 FORMULÄR

Nedan visas ett exempel på ett formulär.

KOLDIOXIDUTVECKLING

1. **LABORATORIUM**

2. **DATUM VID INLEDNING AV TEST**

3. **TESTÄMNE**

Namn:

Stamlösningens koncentration: .... mg/l ämne

▼B

Startkoncentration i mediet: .... mg/l ämne

Total C tillsatt till kolven: .... mg C

$ThCO_2$: ... mg CO_2

4. **INOKULAT**

Källa:

Behandling:

Eventuell förbehandling:

Koncentration av uppslammat torrämne i reaktionsblandningen: ... mg/l:

5. **KOLDIOXIDUTVECKLING OCH NEDBRYTBARHET**

Metod: $Ba(OH)_2$/NaOH/annat

Tid (dagar)	Utvecklat CO_2 test (mg)		Utvecklat CO_2 blind (mg)		utvecklat CO_2 kumulerat (mg) (test minus blindprov)		% $\frac{CO_2}{ThCO_2} \times 100$		
	1 / 2	medel	3 / 4	medel	1	2	1	2	medel
0									
n_1									
n_2									
n_3									
28									

Anmärkning: Motsvarande uppställning kan användas för referenskemikalie och toxicitetskontrollproverna.

6. **KOLANALYS (valfritt)**

Kolanalysator:

Tid (dagar)	Blindprov mg/l	Testkemikalie mg/l
0	$C_{b(o)}$	C_o
28 (*)	$C_{b(t)}$	c_t

(*) Eller vid inkuberingens avslutning.

▼B

$$\% \text{ DOC avlägsnat} = \left(1 - \frac{C_t - C_{b(t)}}{C_t - C_{b(o)}}\right) \times 100$$

7. **ABIOTISK NEDBRYTNING (valfritt)**

$$\% \text{ abiotic degradation} = \frac{CO_2 \text{ utveckling i steril kolv efter 28 dagar (mg)}}{ThCO_2 (mg)} \times 100$$

DEL V. **MANOMETRISK RESPIROMETRITEST** (metod C.4-D)

V.1 TESTMETODSPRINCIP

En uppmätt mängd oorganiskt medium innehållande inokulat och, som nominella enda organiska kolkälla, testämne av känd koncentration (100 mg testämne per liter motsvarande minst 50–100 mg ThOD per liter) rörs om i en stängd kolv vid konstant temperatur (± 1 °C eller mindre) i upp till 20 dagar. Syreförbrukningen bestäms antingen genom mätning av den mängd syre (elektrolytiskt framställt) som krävs för att upprätthålla konstant gasvolym i respirometerkolven, eller utifrån volym- eller tryckändringen (eller en kombination av dessa) i apparaten. Utvecklat koldioxid absorberas i en kaliumhydroxidlösning eller annat lämpligt absorptionsmedel. Den syremängd som testkemikalien har tagit upp (korrigerat mot den parallella inokulatblindprovets upptagning) uttrycks i procent av ThOD eller COD. Frivilligt kan primär bionedbrytning också beräknas genom kompletterande specifik analys vid inkubationsperiodens början och slut, och fullständig bionedbrytning genom DOC-analys.

V.2 TESTMETODSBESKRIVNING

V.2.1 **Apparatur**

a) Lämplig respirator.

b) Temperaturreglering inom ± 1 °C eller mindre.

c) Membranfiltreringsapparatur (valfritt).

d) Kolanalysator (valfritt).

V.2.2 **Framställning av oorganiskt medium**

Se I.6.2 om framställning av stamlösning.

10 ml av lösningen a) blandas med 800 ml utspädningsvatten, och av lösning b), c) och d) tillsätts 1 ml av varje, varefter det fylls upp till 1 liter med utspädningsvatten.

V.2.3 **Framställning och förbehandling av inokulat**

Inokulat kan stamma från en rad olika källor: aktiverat slam, avloppsvatten, ytvatten och ytjord eller en blandning av dessa.

Se I.6.4, I.6.4.1, I.6.4.2 och I.6.5.

V.2.4 **Förberedelse av kolvarna**

Utifrån stamlösningarna framställs det särskilda lösningar av test- och referensämne i oorganiskt medium med en kemikaliekoncentration av normalt 100 mg/l (motsvarande minst 50–100 mg ThOD per liter).

▼B

ThOD beräknas på grundval av ammoniumsalt, såvida inte nitrifikation förväntas, i vilket fall beräkningen baseras på nitratbildning (se bilaga II.2).

pH justeras vid behov till 7,4 ± 0,2.

Svårlösliga ämnen tillsätts vid en senare tidpunkt.

Om testämnets toxicitet ska bestämmas framställs ytterligare en lösning i oorganiskt medium, som innehåller både test- och referensämne i samma koncentration som i de individuella lösningarna.

Om det är nödvändigt att bestämma den fysiska-kemiska syreupptagningen framställs en lösning av testämne i en koncentration av normalt 100 mg ThOD per liter som steriliseras vid tillsättningen av ett passande giftigt ämne (se I.6.6).

Den nödvändiga mängden av test- respektive referensämneslösningarna överförs till minst två kolvar (dubbel bestämning). Ytterligare kolvar med enbart oorganiskt medium förbereds (inokulatblindprover) och om det är nödvändigt med den blandade test- och referensämneslösningen och med den sterila lösningen.

Om testämnet är svårlösligt tillsätts det direkt vid denna tidpunkt, antingen på grundval av vikt eller volym eller genom hanteringen enligt bilaga III. Dessutom tillsätts kaliumhydroxid, natriumhydroxidparlor eller ett annat absorptionsmedel till CO_2-kamrarna.

V.2.5 **Antal kolvar i en typisk testserie**

Kolv 1 och 2: testuppslammning

Kolv 3 och 4: inokulatblind

Kolv 5: förfarandekontroll

Rekommenderas, och vid behov:

Kolv 6: abiotisk steril kontroll

Kolv 7: adsorptionskontroll

Kolv 8: toxicitetskontroll

Se I.6.7.

V.2.6 **Utförande av testet**

Låt behållarna stå tills de har nått den önskade temperaturen och tillsätt förberett aktiverat slam eller ett annat inokulat till de ifrågavarande behållarna så att en koncentration av uppslammat torrämne på högst 30 mg/l erhålls. Montera apparaturen, starta omrörningen, kontrollera lufttätheten och börja mäta syreupptagningen. Normalt krävs det ingen annan passning än de nödvändiga avläsningarna och daglig kontroll av att temperaturen är korrekt och omrörningen tillräcklig.

Syreupptagningen beräknas på grundval av ofta förekommande regelbundna avläsningar som görs enligt apparaturtillverkarens anvisningar. Vid inkubationstidens avslutning, normalt 28 dagar, mäts pH-värdet i kolvarna, särskilt om syreupptagningen har varit mycket låg eller större än $ThOD_{NH4}$ (för kvävehaltiga föreningar).

▼B

Om det är nödvändigt tas prover från respirometerkolvarna före och efter inkuberingen för DOC-analys eller specifik kemisk analys (se bilaga II.4). Man ska se till att volymen av den testuppslamning som kvarstår i kolven efter den första provtagningen är känd. Om testämnet är N-haltigt bestäms koncentrationsökningen av nitrit och nitrat under 28 dagar, och korrektionen för syreförbrukningen genom nitrifikation beräknas (bilaga V).

V.3 DATA OCH RAPPORTERING

V.3.1 **Behandling av resultaten**

Testkemikaliens syreupptagning (mg) efter en viss tid (korrigerad för inokulatblindprovens syreupptagning under samma tid) divideras med vikten av använd mängd testämne. Av detta framkommer BOD uttryckt i mg syre per mg testämne, dvs.

$$\text{BOD} = \frac{(\text{mg } O_2 \text{ upptaget av testämne} - \text{mg } O_2 \text{ upptaget av blindproven})}{(\text{mg testämne i kolven})}$$

$$= \text{mg } O_2 \text{ per mg testämne}$$

Den procentuella bionedbrytningen beräknas antingen genom

$$\%\ \text{bionedbrytning} = \%\ \text{ThOD} = \frac{\text{BOD}(\text{mg } O_2/\text{mg kemikalie})}{\text{ThOD}(\text{mg } O_2 \text{ kemikalie})} \times 100$$

eller

$$\%\ \text{COD} = \frac{\text{BOD}(\text{mg } O_2/\text{mg kemikalie})}{\text{COD}(\text{mg } O_2 \text{ kemikalie})} \times 100$$

Det bör noteras att de två metoderna inte nödvändigtvis ger samma resultat. Den förstnämnda metoden föredras.

För testämnen som innehåller kväve används passande ThOD (NH_4 eller NO_3) i enlighet med vad som är känt eller förväntas om förekomst av nitrifikation (bilaga II.2). Om ofullständig nitrifikation sker beräknas korrektionen för syreförbrukning till nitrifikation på grundval av ändringarna i nitrit- och nitratkoncentrationen (bilaga V).

Om man beslutar sig för att göra bestämningar av organiskt kol och en specifik kemikalie beräknas den procentuella nedbrytningen i enlighet med punkt I.7.

Alla resultat noteras på tillhörande formulär.

V.3.2 **Resultatens giltighet**

Inokulatblindprovens syreupptagning är normalt 20–30 mg O_2/l på 28 dagar och bör inte vara större än 60 mg/l. Om det finns värden över 60 mg/l måste data och försökstekniker granskas noggrant. Om pH ligger utanför intervallet 6–8,5 och testämnets syreupptagning är mindre än 60 % upprepas testet med lägre testämneskoncentrationer.

Se också I.5.2.

▼B

V.3.3 **Rapportering**

Se I.8.

V.4 **FORMULÄR**

Nedan visas ett exempel på ett formulär.

MANOMETRISK RESPIROMETRI

1. **LABORATORIUM**

2. **DATUM VID INLEDNING AV TEST**

3. **TESTÄMNE**

Namn:

Stamlösningens koncentration: .... mg/l ämne

Startkoncentration i mediet: C_o: .... mg/l ämne

Volymen i testkolv (V): .... ml

ThOD eller COD: ... mg O_2/mg testämne (NH_4, NO_3).

4. **INOKULAT**

Källa:

Behandling:

Eventuell förbehandling:

Koncentration av uppslammat torrämne i reaktionsblandningen: ... mg/l:

5. **SYREUPPTAGNING: BIONEDBRYTNING**

		Tid (dagar)											
		0		7		14			21			28	
O_2 uppt. (mg) tescämne	1												
	2												
	a, medel												
O_2 uppt. (mg) blindprov	3												
	4												
	b, medel												
Korrigerat BOD (mg)	$(a_1 - b_m)$												
	$(a_2 - b_m)$												
BOD per mg testämne	$\frac{(a_1 - b)}{C_o V}$												
	$\frac{(a_2 - b)}{C_o V}$												

▼B

		Tid (dagar)											
		0		7		14			21			28	
% nedbrytning $\frac{BOD}{ThOD} \times 100$	D_1 (a_1)												
	D_2 (a_2)												
	medel (*)												

V = volymen av medium i testkolven.
(*) Genomsnittet av D_1 och D_2 ska inte tas om det föreligger en väsentlig skillnad.

Anmärkning: En motsvarande uppställning kan användas för referenskemikalien och toxicitetskontrollproven.

6. **KORREKTION FÖR NITRIFIKATION (se bilaga V)**

Dag		0	28	skillnad
i)	Nitratkoncentration (mg N/l)			(N)
ii)	Syreekvivalent (4,57 x N x V) (mg)	—	—	
iii)	Nitritkoncentration (mg N/l)			(N)
iv)	Syreekvivalent (3,43 x N x V) (mg)	—	—	
ii + iv)	Total syreekvivalent	—	—	

7. **KOLBESTÄMNING** (valfritt)

Kolanalysator:

Tid (dagar)	Blindprov mg/l	Testkemikalie mg/l
0	(C_{blo})	(C_0)
28 (*)	(C_{blt})	(C_t)

(*) Eller vid inkuberingens slut.

$$\% \text{ DOC avlägsnat} = \left(1 - \frac{C_t - C_{blt}}{C_o - C_{blo}}\right) \times 100$$

8. **SPECIFIK KEMIKALIEBESTÄMNING (valfritt)**

S_b = koncentrationen av testkemikalien i steril kontrollkolv efter 28 dagar

S_a = koncentrationen av testkemikalien i kolv med inokulat efter 28 dagar

$$\% \text{ bionedbrytning} = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

9. **ABIOTISK NEDBRYTNING (valfritt)**

a = syreförbrukningen i sterila kolvar efter 28 dagar (mg)

$$\text{Syreförbrukning pr mg testämne} = \frac{a \times 100}{C_o V}$$

▼B

(se avsnitt 1 och 3)

$$\% \text{ abiotisk nedbrytning} = \frac{a \times 100}{C_o V \times ThOD}$$

DEL VI. **CLOSED BOTTLE-TEST (metod C.4-E)**

VI.1 TESTMETODSPRINCIP

Till en normal 2–5 mg/l lösning av testämnet i oorganiskt medium tillsätts inokulat bestående av ett förhållandevis litet antal mikroorganismer från en blandad population, och lösningen förvaras i mörker vid konstant temperatur i helt fyllda slutna kolvar. Nedbrytningen följs under 28 dagar genom analys av upplöst syre. Den syremängd som testämnet har förbrukat korrigeras för den syremängd som har förbrukats i det parallella inokulatblindprovet, och uttrycks i procent av ThOD eller COD.

VI.2 TESTMETODSBESKRIVNING

VI.2.1 **Apparatur**

a) BOD-kolvar med glaspropp, t.ex. 250–300 ml.

b) Vattenbad eller inkuberingsapparat, som kan hålla kolvarna vid konstant temperatur (± 1 °C eller mindre) i mörker.

c) Stora glasflaskor (2–5 l) för framställning av medium och uppfyllning av BOD-kolvarna.

d) Syreelektrod och syremätare eller utrustning och reagenser för Winkler-titrering.

VI.2.2 **Framställning av oorganiskt medium**

Se I.6.2 om framställning av stamlösning.

1 ml lösning a), b), c) och d) förtunnas till 1 liter med vatten.

VI.2.3 **Framställning av inokulat**

Inokulat tas normalt från sekundärt avloppsvatten från ett reningsverk eller en laboratorieanläggning som huvudsakligen behandlar avloppsvatten från hushåll. En alternativ inokulatkälla är ytvatten. Normalt används från en droppe (0,5 ml) till 5 ml filtrat per liter medium. Av-provningar kan vara nödvändiga för att klarlägga den optimala volymen för ett visst avloppsvatten (se I.6.4.2 och I.6.5).

VI.2.4 **Förberedelse av kolvar**

Det oorganiska mediet luftas kraftigt i minst 20 minuter. En given försöksserie utförs med oorganiskt medium från samma sats. Normalt är mediet färdigt för användning efter att ha stått i 20 minuter vid testtemperaturen. Som kontroll bestäms koncentrationen av upplöst syre. Värdena ska ligga omkring 9 mg/l vid 20 °C. All överföring och uppfyllning med det luftmättade mediet utförs utan att det bildas bubblor, t.ex. genom användning av hävert.

▼B

Parallella grupper av BOD-kolvar förbereds för samtidiga försök med test- och referensämne. Minst så många BOD-kolvar, inbegripet inokulatblindprover, samlas så att minst dubbla bestämningar kan företas av syreförbrukningen med önskade regelbundenhet, t.ex. efter 0, 7, 14, 21 och 28 dagar. Det kan vara nödvändigt att använda flera kolvar om man säkert ska kunna identifiera 10-dagarsfönstret.

De stora kolvarna fylls upp till en tredjedel med fullt luftat oorganiskt medium. Därefter tillsätts så mycket stamlösning av test- och referensämne till olika kolvar att deras slutkoncentration normalt inte blir större än 10 ml/l. Till en särskild kolv med kontrollmedium tillsätts inga kemikalier.

För att vara säker på att inokulataktiviteten inte begränsas får koncentrationen av upplöst syre inte understiga 0,5 mg/l i BOD-kolvarna, vilket begränsar testkemikaliens koncentration till ca 2 mg/l. Av svårt nedbrytbara ämnen och ämnen med lågt ThOD kan det dock användas 5–10 mg/l. I vissa fall rekommenderas parallella serier med testämne i två olika koncentrationer, t.ex. 2 och 5 mg/l. Normalt beräknas ThOD på grundval av bildandet av ammoniumsalt, men om nitrifikation förväntas beräknas värdena på grundval av nitratbildning ($ThOD_{NO3}$; se bilaga II.2). Om ofullständig nitrifikation sker korrigeras det för ändringar i nitrit- och nitratkoncentrationen, som är bestämd genom analys (se bilaga V).

Ytterligare en serie kolvar krävs om testämnets toxicitet ska undersökas (t.ex. om ett lågt bionedbrytbarhetsvärde tidigare påvisats).

För detta förbereds ytterligare en stor kolv med luftat oorganiskt medium (ca en tredjedel full) plus testämne och referensämne normalt i samma slutkoncentration som i de andra kolvarna.

Inokulat tillsätts till kolvarna i form av sekundärt avloppsvatten (från 1 droppe [0,5 ml] till 5 ml per liter) eller t.ex. flodvatten (se I.6.4.2). Slutligen fylls det upp med luftat oorganiskt medium med användning av en slang som når ända ner till botten, så att tillräcklig omrörning säkerställs.

VI.2.5 **Antal kolvar i en typisk testserie**

I en typisk testserie används följande antal kolvar:

— minst 10 med testämne och inokulat (testuppslamning),

— minst 10 med inokulat (inokulatblindprov),

— minst 10 med referensämne och inokulat (procedurkontroll),

▼B

— och i vissa fall 6 kolvar med testämne, referensämne och inokulat (toxicitetskontroll). För att säkert kunna identifiera 10-dagarsfönstet krävs dock dubbelt antal kolvar.

VI.2.6 Genomförande av testet

De framställda lösningarna fördelas omedelbart i de berörda grupperna av BOD-kolvar, i det att de sugs upp från den nedersta fjärdedelen (inte botten) av den passande stora kolven med en slang, och således att alla BOD-kolvarna fylls helt. Eventuella luftbubblor avlägsnas genom lätta slag på kolvens sida. Starttidskolvarna analyseras omedelbart för upplöst syre antingen genom Winkler-metoden eller med elektrod. Innehållet i kolvarna kan förvaras för senare analys med Winkler-metoden om man omedelbart tillsätter mangan(II)sulfat och natriumhydroxid (den första Winkler-reagensen). De väl tillproppade kolvarna, där syret är fixerat som brunt hydratiserat mangan(III)oxid kan förvaras i mörker vid 10–20 °C i högst 24 timmar innan Winkler-testet avslutas. Resterande kolvar tillproppas och man ser till att inga luftbubblor innesluts, och de inkuberas vid 20 °C i mörker. Parallellt med varje serie ska det göras en fullständig serie för bestämning av inokulatblindvärden. Under de 28 dagarnas inkubering uttas med bestämda intervaller (minst en gång i veckan) minst 2 kolvar av varje serie för analys av upplöst syre.

Med veckovis provtagning skulle det procentuella avlägsnandet kunna bedömas i ett 14-dagarfönster, medan det vid provtagning var 3–4 dag, vilket skulle kräva ca dubbelt så många kolvar, blir möjligt att identifiera 10-dagarfönstret.

För N-haltiga ämnen måste det korrigeras för syreförbrukning vid eventuell nitrifikation. För detta används en O_2-elektrod för bestämning av koncentrationen av upplöst syre, varefter det tas ett prov från BOD-kolven för analys av nitrit och nitrat. Den förbrukade syremängden beräknas på grundval av ökningen av nitrit- och nitratkoncentrationen (se bilaga V).

VI.3 DATA OCH RAPPORTERING

VI.3.1 **Behandling av resultat**

Först beräknas BOD efter varje tidsintervall genom att dra ifrån syreförlusten (mg O_2 per liter) i inokulatblindproven från syreförlusten i kolven med testämne. Denna korrigerade syreförlust divideras med testämnets koncentration (mg/l), varefter den specifika BOD framkommer i mg syre per mg testämne. Den procentuella bionedbrytbarheten beräknas genom att dividera den specifika BOD med den specifika ThOD (beräknad i enlighet med bilaga II.2) eller COD (bestämt genom analys, se bilaga II.3), dvs.

$$\text{BOD} = \frac{(\text{mg } O_2 \text{ upptaget av testämne} - \text{mg } O_2 \text{ upptaget av blindproven})}{(\text{mg test chemical in flask})}$$

▼B

= mg $O_{2\ per}$ mg testämne

$$\% \text{ nedbrytning} = \frac{\text{BOD (mg } O_2/\text{mg testämne)}}{\text{ThOD(mg } O_2/\text{mg testämne)}} \times 100$$

eller

$$\% \text{ nedbrytning} = \frac{\text{BOD (mg } O_2/\text{mg testämne)}}{\text{COD(mg } O_2/\text{mg testämne)}} \times 100$$

Observera att dessa två metoder inte nödvändigtvis ger samma resultat. Den först nämnda metoden rekommenderas.

Den ThOD (NH_4 eller NO_3) som motsvarar det föreliggande kännedomen om nitrifikation (bilaga II.2) används. Om ofullständig nitrifikation sker beräknas korrektionen för syreförbrukningen till nitrifikationen ut i från ändringarna i nitrit- och nitratkoncentrationen (bilaga V).

VI.3.2 **Resultatens giltighet**

Inokulatblindprovens syreförlust bör inte vara större än 1,5 mg upplöst syre per liter efter 28 dagar. Om det finns högre värden måste försöksteknikerna granskas kritiskt. Restkoncentrationen av syre i testkolvarna får inte understiga 0,5 mg/l vid något tillfälle. Mätningar av så lågt syreinnehåll är endast giltiga om den använda mätmetoden för upplöst syre tillåter noggrann mätning av så lågt innehåll.

Se också I.5.2.

VI.3.3 **Rapportering**

Se 1.8.

VI.4 FORMULÄR

Nedan visas ett exempel på ett formulär.

CLOSED BOTTLE TEST

1. **LABORATORIUM**

2. **DATUM VID INLEDNING AV TEST**

3. **TESTÄMNE**

   Namn:

   Stamlösningens koncentration: .... mg/l

   Startkoncentration i kolven: .... mg/l

   ThOD eller COD: ... mg O_2/mg testämne

4. **INOKULAT**

   Källa:

   Behandling:

▼B

Eventuell förbehandling:

Koncentration i reaktionsblandningen: ... mg/l:

5. **DOC-BESTÄMNING**

Metod: Winkler/elektrod

Kolvanalys

Inkuberingstid (dagar)			DO (mg/l)			
			0	n_1	n_2	
Blindprov (utan testämne)	1	C_1				
	2	C_2				
Genomsnitt	$m_b = \frac{C_1 + C_2}{2}$					
Testämne	1	a_1				
	2	a_2				
Genomsnitt	$m_t = \frac{a_1 + a_2}{2}$					

Anmärkning: En motsvarande uppställning kan användas för referenskemikalien och toxicitetskontrollproverna.

6. **KORREKTION FÖR NITRIFIKATION (se bilaga V)**

Inkuberingstid (dagar)		0	n_1	n_2	n_3
i)	Nitratkoncentration (mg N/l)				
ii)	Ändring i nitratkoncentration (mg N/l)	—			
iii)	Syreekvivalent (mg/l)	—			
iv)	Nitritkoncentration (mg N/l)				
v)	Ändring i nitritkoncentration (mg N/l)	—			
vi)	Syreekvivalent (mg/l)	—			
iii + vi)	Total syreekvivalent (mg/l)	—			

7. **FÖRLUST AV DO: % NEDBRYTNING**

	Förlust efter n dagar (mg/l)			
	n_1	n_2	n_3	
KOLV 1: $(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})$				
KOLV 2: $(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})$				

▼B

	Förlust efter n dagar (mg/l)			
	n_1	n_2	n_3	
KOLV 1: $\%D_1 = \frac{[(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})] \times 100}{\text{konc. av test} \times \text{ThOD för ämne}}$				
KOLV 2: $\%\ D_2 = \frac{[(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})] \times 100}{\text{konc. av test} \times \text{ThOD för ämne}}$				
$\%\ \text{D genomsn. (*)} = \frac{D_1 - D_2}{2}$				

(*) Ta inte genomsnittet om det föreligger väsentlig skillnad med replikaterna.

m_{to} = värde i testkolven vid tid 0

m_{tx} = värde i testkolven vid tid x

m_{bo} = genomsnittsblindvärde vid tid 0

m_{bx} = genomsnittsblindvärde vid tid x

Dessutom företas korrektion för nitrifikation i enlighet med punkt 6.

8. **BLINDPROVER FÖR FÖRLUST AV DO**

Syreförbrukningen i blindprov: (m_{bo} – m_{b28}) mg/l. Denna förbrukning är av betydelse för testets giltighet och får högst vara 1,5 mg/l.

DEL VII. **MITI TEST (metod C.4-F)**

VII.1 TESTMETODSPRINCIP

Syreupptagningen i en omrörd lösning eller uppslamning av testämnet i oorganiskt medium, som är tillsatt inokulat i form av särskild odlade ej tillvanda mikroorganismer, mäts automatiskt under 28 dagar i en mörklagd sluten respirometer vid 25 ± 1 °C. Den utvecklade koldioxiden absorberas i natriumhydroxid. Bionedbrytbarheten uttrycks som den upptagna syremängden (korrigerat för blindprovens upptagning) i procent av den teoretiska syreupptagningen (ThOD). Även den procentuella primära bionedbrytbarheten beräknas, på grundval av kompletterande specifika kemiska analyser vid inkuberingens början och slut och eventuellt genom DOC-analys.

VII.2 TESTMETODSBESKRIVNING

VII.2.1 **Apparatur**

a) Automatisk elektrolytisk BOD-mätare eller respirometer, normalt med 6 kolvar på vardera 300 ml och med skålar för CO_2-absorbtionsmedel.

▼B

b) Lokal med konstant temperatur och vattenbad på 25 ± 1 °C eller mindre.

c) Membranfiltreringsutrustning (valfritt).

d) Kolanalysator (valfritt).

VII.2.2 **Framställning av oorganiskt medium**

Följande stamlösningar framställs av reagenser av analyskvalitet och vatten (I.6.1):

a)	monokaliumdihydrogenorthofosfat, KH_2PO_4	8,50 g
	dikaliummonohydrogenorthofosfat, K_2HPO_4	21,75 g
	dinatriummonohydrogenorthofosfat dodecahydrat, Na_2HPO_4 12 H_2O	44,60 g
	ammoniumklorid, NH_4CI	1,70 g
	Upplöses i vatten och förtunnas till 1 liter.	
	Upplösningens pH ska vara 7,2.	
b)	magnesiumsulfat heptahydrat, $MgSO_4$ 7 H_2O	22,50 g
	Upplöses i vatten och förtunnas till 1 liter.	
c)	Kalciumklorid, vattenfritt, $CaCl_2$	27,50 g
	Upplöses i vatten och förrunnas till 1 liter.	
d)	Järn(III)klorid hexahydrat, $FeCl_3$ 6 H_2O	0,25 g
	Upplöses i vatten och förtunnas till 1 liter.	

3 ml tas av lösning a, b, c och d och förtunnas till 1 liter.

VII.2.3 **Framställning av inokulat**

Friska prover samlas in från minst 10 platser, huvudsakligen områden där det används och utleds olika kemikalier. Från sådana platser som reningsverk, floder, sjöar och havsområden insamlas 1-liters prover av slam, ytjord, vatten, etc. och allt blandas ordentligt. Material som flyter ovanpå avlägsnas och efter ett tag anpassas supernatanten till pH 7 ± 1 med natriumhydroxid och fosforsyra.

En passande mängd filtrat används för att fylla en ”fill-and-draw” aktiv slambehållare, och vätskan luftas i ca 23 timmar 30 minuter. 30 minuter efter det att luftningen avslutats hälls omkring en tredjedel av den samlade supernatant-volymen bort och det tillsätts en lika stor mängd av en lösning (med pH 7) som innehåller 0,1 % glukos, 0,1 % pepton och 0,1 % monokaliumorthoforfat, och luftningen påbörjas. Detta sker varje dag. Slamenheten drivs efter god praxis: avloppsvattnet ska vara klart, temperaturen ska hållas vid 25 ± 2 °C, pH ska vara 7 ± 1, slam ska bottenfällas bra, tillräcklig luftning ska upprätthållas för att hålla blandningen konstant aerob, protozoer ska finns till hands och slamaktiviteten ska testas mot referensämnet minst var tredje månad. Slammet får tidigast användas som inokulat efter en månads drift och inte senare än efter fyra månaders drift. Därefter uttas regelbundet prover från minst 10 platser var tredje månad.

▼B

För att hålla det friska och det gamla slammet på samma aktivitet blandas den filtrerade supernatanten från aktivt slam genom användning av lika mycket filtrerat supernatant från en färskt insamlat blandning från 10 källor, och denna vätska odlas i enlighet med ovan. 18–24 timmar efter det att enheten fyllts upp kan det tas slam för användning som inokulat.

VII.2.4 **Förberedelse av kolvar**

Sex kolvar förbereds enligt följande:

Nr 1: testämne i förtunningsvatten, 100 mg/l

Nr 2, 3 och 4: testämne förtunnat med oorganiskt medium till 100 mg/l

Nr 5: referensämne (t.ex. anilin) förtunnat med oorganiskt medium till 100 mg/l

Nr 6: rent oorganiskt medium

Svårlösliga testämnen tillsätts direkt på vikt- eller volymbasis eller hanteras i enlighet med bilaga III, bortsett från att varken lösningsmedel eller emulgatorer får användas. CO_2-absorptionsmedel placeras i alla kolvar i den särskilda skålen. pH i kolv nr 2, 3 och 4 justeras till 7,0.

VII.2.5 **Genomförandet av testet**

En liten mängd inokulat tillsätts till kolv nr 2, 3 och 4 (testuppslamningar), nr 5 (aktivitetskontroll) och nr 6 (inokulatblinprov) så att koncentrationen av uppslammat torrämne blir 30 mg/l. Inokulat tillsätts inte till kolv nr 1 som tjänar som abiotisk kontroll. Utrustningen samlas ihop, lufttätheten kontrolleras, omrörarna startas och syreupptagningsmätningen startas i mörker. Temperaturen, omrörningen och den coulometeriska syreupptagningsskrivaren kontrolleras dagligen och eventuella färgändringar i kolvarna noteras. Syreupptagningen i de 6 kolvarna avläses direkt med hjälp av en passande metod, t.ex. på sexkanalsskrivaren, som ger en BOD-kurva. Vid inkuberingens slut, normalt efter 28 dagar, mäts pH i kolvarna, och koncentrationen av resterande testämne och av eventuella biprodukter och, när det gäller vattenlösliga ämnen, eventuellt DOC-koncentrationen bestäms (bilaga II.4). Särskild försiktighet måste iakttas om det är tal om flyktiga kemikalier. Om nitrifikation förväntas bestäms om möjligt nitrat- och nitritkoncentrationen.

VII.3 DATA OCH RAPPORTERING

VII.3.1 **Behandling av resultat**

Testämnets syreförbrukning (mg) efter en viss tid, korrigerat för syreupptagningen i inokulatblinproven efter samma tid, divideras med den använda viktmängden testämne. Av detta framkommer BOD uttryck som mg syre per mg testämne, dvs.

$$\text{BOD} = \frac{(\text{mg } O_2 \text{ upptaget av testämnet} - \text{mg } O_2 \text{ upptaget av blinproven})}{(\text{mg testämne i kolven})}$$

= mg O_2 per mg testämne

▼B

Den procentuella bionedbrytningen framkommer av:

$$\% \text{ bionedbrytning} = \% \text{ ThOD} = \frac{\text{BOD (mg } O_2\text{per mg kemikalie)}}{\text{ThOD (mg } O_2\text{per mg kemikalie)}} \times 100$$

För blandningar beräknas ThOD på samma sätt som för enskilda ämnen, nämligen på grundval av grundämnesanalysen. Det ThOD som används ($ThOD_{NH4}$ eller $ThOD_{NO3}$) beror på om nitrifikationen är frånvarande eller fullständig (bilaga II.2). Om ofullständig nitrifikation sker beräknas korrektionen för syreförbrukningen till nitrifikationen utifrån ändringarna i nitrit- och nitratkoncentrationen (bilaga V).

Den procentuella primära bionedbrytningen beräknas på grundval av den mängd av den specifika (ursprungliga) kemikalie som försvinner (se I.7.2).

$$D_t = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100\%$$

Om förlust av testämne har skett i kolv nr 1, som mäter fysisk och kemisk nedbrytning, antecknas detta och testämnets koncentration (S_b) i denna kolv efter 28 dagar används för att beräkna den procentuella bionedbrytningen.

Om (valfria) bestämningar görs av DOC beräknas den procentuella fullständiga bionedbrytningen genom:

$$D_t = \left(1 - \frac{C_t - C_{bt}}{C_o - C_{bo}}\right) \times 100\%$$

i enlighet med punkt I.7.1. Om testämne (DOC) har försvunnit från kolv nr 1, som mäter fysisk och kemisk nedbrytning, används DOC-koncentrationen i denna kolv för att beräkna den procentuella bionedbrytningen.

Alla resultat noteras på de tillhörande formulären.

VII.3.2 **Resultatens giltighet**

Inokulatblinprovens syreförbrukning är normalt 20–30 mg O_2/l efter 28 dagar och bör inte vara större än 60 mg/l. Om det finns värden över 60 mg/l måste data och försöksteknikerna granskas kritiskt. Om pH ligger utanför intervallet 6–8,5 och testämnets syreförbrukning är mindre än 60 % upprepas testet med lägre testämneskoncentrationer.

Se även I.5.2.

Om den procentuella nedbrytningen av anilin, beräknat utifrån syreförbrukningen, inte är större än 40 % efter 7 dagar och 65 % efter 14 dagar anses testet vara ogiltigt.

VII.3.3 **Rapportering**

Se I.8.

VII.4 RESULTATFORMULÄR

Nedan visas ett exempel på ett formulär.

MITI (I) TEST

1. **LABORATORIUM**

2. **DATUM VID INLEDNING AV TEST**

▼B

3. **TESTÄMNE**

Namn:

Stamlösningens koncentration: .... mg/l ämne

Startkoncentration i kolven, C_0: .... mg/l ämne

Reaktionsblandningens volym, V: .... ml

ThOD: ... mg O_2/l

4. **INOKULAT**

Platser för provtagningen:

1) .... 6) ....

2) .... 7) ....

3) .... 8) ....

4) .... 9) ....

5) .... 10) ....

Koncentrationen av uppslammat torrämne i det aktiva slammet efter acklimatisering med syntetiskt avloppsvatten: .... mg/l.

Volym av aktivt slam per liter slutmedium: ... ml.

Slamkoncentration i slutmedium: … mg/l

5. **SYREUPPTAGNING: BIONEDBRYTBARHET**

Respirometertyp:

			Tid (dagar)				
			0	7	14	21	28
O_2 upptag. (mg) testämne	a_1						
	a_2						
	a_3						
O_2 upptag. (mg) blindprov	b						
Korrigerat O_2 upptag. (mg)	$(a_1 - b_1)$ $(a_1 - b_1)$ $(a_1 - b_1)$						
BOD per mg testämne	$\frac{(a - b)}{C_o V}$	Kolv 1					
		Kolv 2					
		Kolv 3					
% nedbrytning $\frac{BOD}{ThOD} \times 100$		1					
		2					
		3					
		genomsn. (*)					

(*) Ta inte genomsnittet om det föreligger en väsentlig skillnad mellan replikaterna.

▼B

Anmärkning: En motsvarande uppställning kan användas för referenskemikalien och toxicitetskontrollproven.

6. **KOLANALYS** (valfritt)

Kolanalysator:

Kolv	DOC				% DOC avlägsnat	Genomsnitt
	Mätt		Korrigerat			
Vatten + testämne	a				—	—
Slam + testämne	b_1		$b_1 - c$			
Slam + testämne	b_2		$b_2 - c$			
Slam + testämne	b_3		$b_3 - c$			
Kontrollblind	c		—		—	—

$$\% \text{ DOC removed} : \frac{a_1 - (b - c)}{a} \times 100$$

7. **DATA FRÄN SPECIFIK KEMISK ANALYS**

	Restmängd av testämne vid testets avslutning	% nedbrytning
Blindprov med vatten	S_b	
Medium med inokulat	S_{a1}	
	S_{a2}	
	S_{a3}	

$$\% \text{ nedbrytning} = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

% nedbrytning beräknas för kolv a_1, a_2 och a_3.

8. **ANMÄRKNINGAR**

En kurva över BOD mot tiden ska bifogas, om sådan föreligger.

▼B

Bilaga I

FÖRKORTNINGAR OCH DEFINITIONER

DO: Upplöst syre (mg/l) definieras som koncentrationen av upplöst syre i ett vattnigt prov.

BOD: Biokemisk syreförbrukning (g) definieras som den mängd syre som mikroorganismer förbrukar vid metabolism av testämnet. Resultatet uttrycks också som gram upptaget syre per gram testat ämne (se metod C.5).

COD: Kemisk syreförbrukning (g) definieras som den mängd syre som förbrukas vid oxidering av testämnet med varm dikromat i sur vätska. Det är ett mått på den motsvarande mängden oxiderbart ämne; uttrycks också i g förbrukat syre per g testämne (se metod C.6).

DOC: Upplöst organiskt kol definieras som den mängd organiskt kol som finns i lösningen, passerar genom ett 0,45 μm filter eller förblir i centrifugatet efter centrifugering vid 40 000 m • s^{-2} (±4 000 g) i 15 minuter.

ThOD: Teoretisk syreförbrukning (mg) definieras som den samlade mängden syre som krävs för fullständig oxidering av ett kemiskt ämne. Det beräknas på grundval av bruttoformeln (se bilaga II, punkt 2) och uttrycks också i mg syre per mg testämne.

$ThCO_2$: Teoretiskt koldioxid (mg) definieras som den mängd koldioxid som enligt beräkningar på grundval av testämnets kända eller mätta kolinnehåll skulle bildas vid fullständig nedbrytning av testämnet. Det uttrycks också i mg utvecklad koldioxid per mg testämne.

TOC: Ett provs totala innehåll av organiskt kol definieras som summan av organiskt kol i lösning och uppslamning.

IC: Oorganiskt kol.

TC: Ett provs totala kolinnehåll definieras som summan av organiskt och oorganiskt kol.

Primär bionedbrytning

definieras som en ändring av ett ämnes kemiska struktur, framkallad på biologisk väg, som resulterar i att ämnet mister sina specifika egenskaper.

Fullständig bionedbrytning (aerob)

definieras som den nedbrytningsgrad som har nåtts när mikroorganismer har förbrukat ett testämne fullständigt samtidigt som koldioxid, vatten, oorganiska salter och nya celldelar bildas (biomassa).

Lätt bionedbrytning

kännetecknar en godtycklig klass kemikalier som har klarat vissa specifika screeningtester för fullständig bionedbrytning. Dessa tester är så krävande att sådana ämnen snabbt kommer att fullständigt brytas ned i vattnig miljö under aeroba förhållanden.

▼B

Inherent (potentiell) bionedbrytbarhet

karakteriserar en klass kemikalier för vilka det finns klara bevis på bionedbrytning (primär eller fullständig) vid varje erkänt test av bionedbrytbarhet.

Behandlingsmöjlighet

definieras som möjligheten av avlägsna ett ämne genom biologisk avloppsvattenrening utan att avloppsvattenreningsprocessernas normala förlopp påverkas. Generellt är alla lätt bionedbrytbara ämnen behandlingsbara, men inte alla inherent bionedbrytbara ämnen. Abiotiska processer kan också inverka på detta.

Lag-period

definieras som den tid som går vid ett elimineringstest från inokuleringen tills dess att nedbrytningsprocenten är minst 10 %. Lag-perioden varierar ofta stort och är svår att reproducera.

Nedbrytningstid

definieras som tiden mellan lagperiodens slut och den tid då nedbrytningen har nått 90 % av sitt maximala värde.

10-dagarsfönstret

definieras som den period på 10 dagar som börjar när nedbrytningen har nått upp till 10 %.

▼B

Bilaga II

BERÄKNING OCH BESTÄMNING AV LÄMPLIGA HUVUDPARAMETRAR

Beroende på den metod som väljs kan olika huvudparametrar behövas. I detta avsnitt beskrivs hur dessa värden utleds. Parametrarnas användning beskrivs i de individuella metoderna.

1. **Kolhalt**

Kolhalten kan antingen beräknas på grundval av testämnets grundämnessammansättning eller bestämmas genom elementäranalys.

2. **Teoretisk syreförbrukning (ThOD)**

Den teoretiska syreförbrukningen (ThOD) kan beräknas, om grundämnessammansättningen är känd, och annars bestämmas genom elementäranalys. För föreningen

$C_cH_hCl_{cl}N_nNa_{na}O_oP_pS_s$

är det utan nitrifikation

$$ThOD_{NH4} = \frac{16\ [2c + 1/2\ (h - cl - 3\ n) + 3\ s + 5/2\ p + 1/2\ na - o]}{MW}\ mg/mg$$

och med nitrifikation

$$ThOD_{NO3} = \frac{16\ [2c + 1/2\ (h - cl) + 5/2\ n + 3\ s + 5/2\ p + 1/2\ na - o]}{MW}\ mg/mg$$

3. **Kemisk syreförbrukning (COD)**

Den kemiska syreförbrukningen (COD) bestäms enligt metod C.6.

4. **Upplöst organiskt kol (DOC)**

Upplöst organiskt kol (DOC) definieras som den organiska mängd kol i en kemikalie eller en kemikalieblandning som i vattnig lösning kan passera genom ett 0,45 μm filter.

Prover tas från testbehållarna och filtreras omedelbart genom filtreringsutrustningen som är försedd med ett passande membranfilter. De första 20 ml av filtratet kasseras (vid små filter kan denna mängd minskas). 10–20 ml samlas upp för kolanalys (vid insprutning mindre, beroende på den använda kolanalysatorn). DOC-koncentrationen bestäms med hjälp av en organisk kolämnesanalysator som gör det möjligt att noggrant bestämma en kolkoncentration på mindre än 10 % av startkoncentrationen av DOC i testet.

Om filtrerade prover inte kan analyseras samma arbetsdag kan de förvaras i högst 48 timmar i kylskåp vid 2–4 °C eller längre tid vid – 18 °C.

Anmärkningar:

Membranfilter är ofta behandlade med ytaktiva ämnen för att göra dem mer hydrofila. De kan därför innehålla upp till flera mg upplösligt organiskt kol som kommer att påverka bionedbrytbarhetsbestämningen. De ytaktiva ämnena och andra upplösliga organiska ämnen avlägsnas från filtren genom kokning i avjoniserat vatten i tre gånger 1 timme. Om engångsfilter används måste varje parti kontrolleras för att bekräfta att de inte avger upplösligt organiskt kol.

▼B

På vissa typer av membranfilter kan absorption av testämnet inträffa. Kontroll av att testämnet inte hålls kvar på filtret rekommenderas därför.

Centrifugering vid 40 000 ms^{-2} (4 000 g) i 15 minuter kan användas i stället för filtrering när man ska skilja mellan TOC och DOC. Metoden är inte pålitlig vid en startkoncentration av < 10 mg DOC per liter, då antingen inte alla bakterier avlägsnas eller något av kolet i bakteriernas cytoplasma återupplöses.

HÄNVISNINGAR

— Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 12th ed., Am. Pub. Hlth. Ass., Am. Wat. Poll. Control Fed., Oxygen Demand, 1965, s. 65.

— Wagner, R., Von Wasser, 1976, Vol. 46, s. 139.

— DIN-Entwurf 38 409 Teil 412 – Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung, Summarisches Wirkungs- und Stoffkenngrößen (Gruppe H). Bestimmung des Chemischen Sauer-stoffbedarfs (CSB) (H 41), Normenausschüβ Wasserwesen (NAW) in DINN Deutsche Institut für Normung e.V.

— Gerike, P., The biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1948, Vol. 13 (1), s. 169.

▼B

Bilaga III

BEDÖMNING AV SVÅRLÖSLIGA ÄMNENS BIONEDBRYTBARHET

Vid test av svårlösliga ämnens bionedbrytbarhet bör särskild uppmärksamhet ges åt nedanstående.

Trots att homogena vätskor sällan kommer att vålla problem vid provtagningen rekommenderas att homogenisera fasta material på lämpligt sätt, så att fel till följd av inhomogenitet undviks. Särskild omsorg ska ske vid uttagning av ett representativt prov på några få mg av blandningar av kemikalier och av ämnen som innehåller stora mängder orenheter.

Under testet kan man använda olika metoder för omrörning. Omrörningen ska dock vara så kraftig att kemikalien hålls dispergerad, och att överhettning, stark skumning och våldsam förskjutning undviks.

En emulgator kan användas för att framställa en stabil dispersion av kemikalien. Emulgatoren får inte vara toxisk för bakterier och får varken kunna brytas ned biologiskt eller vara skumbildande under testförhållandena.

Samma kriterier som för emulgatorer gäller för lösningsmedel.

Användning av fasta bärarmaterial till fasta testämnen rekommenderas inte, däremot kan de vara lämpliga till oljeaktiga ämnen.

När tillsatsämnen såsom emulgatorer, lösningsmedel och bärarmaterial används utförs ett blindprov med tillsatsämnen.

Alla tre respirometertesterna, CO_2, BOD och MITI kan användas för att undersöka svårlösliga ämnens bionedbrytbarhet.

HÄNVISNINGAR

— de Morsier, A. et al., Biodegradation tests for poorly-soluble compounds. Chemosphere, 1987, Vol. 16, s. 833.

— Gerike, P., The Biodegradation of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, Vol. 13, s. 169.

▼B

Bilaga IV

BEDÖMNING AV BIONEDBRYTBARHETEN HOS KEMISKA ÄMNEN SOM MISSTÄNKS VARA TOXISKA FÖR INOKULAT

Om ett kemiskt ämne som underkastas ett test för lätt bionedbrytbarhet inte verkar vara bionedbrytbart rekommenderas följande förfarande om man vill skilja mellan hämning av bristande bionedbrytbarhet (Reynolds et al., 1987).

Samma eller motsvarande inokulat används för toxicitetstest som för bionedbrytbarhetstest.

För att kunna bedöma toxiciteten hos kemikalier som undersöks i test av lätt bionedbrytbarhet kan man använda en eller en kombination av följande metoder: Hämning av slammets respirationshastighet (aktiverat slam – respirationshämningstest – direktiv 88/302/EEG); BOD och tillväxthämningstest.

Om hämning till följd av toxicitet ska undvikas rekommenderas användning av testämneskoncentrationer i test av lätt bionedbrytbarhet, som högst är 1/10 av de EC_{50}-värden (eller högst de EC_{20}-värden) som erhållits vid toxicitetstest. Ämnen vars EC_{50} är större än 300 mg/l kommer troligtvis inte att ha toxiska verkningar i test för lätt bionedbrytbarhet.

Ett EC_{50} på mindre än 20 gl/l kommer troligtvis att skapa betydande svårigheter vid den efterföljande testningen. Testkoncentrationerna ska vara låga, vilket kräver användning av det strikta och känsliga Closed Bottle-testet eller av ^{14}C-markerat material. Alternativt kan det vid tillvänjning av inokulat bli möjligt att använda högre testämneskoncentrationer. I det sistnämnda fallet mister testet för lätt bionedbrytbarhet dock sin specifika karaktär.

HÄNVISNINGAR

Reynolds, L. et al., Evaluation of the toxicity of substances to be assessed for biodegradability. Chemosphere, 1987, Vol. 16, s. 2259.

▼B

Bilaga V

KORREKTION AV NITRIFIKATIONENS INTERFERENS PÅ SYREUPPTAGNINGEN

Fel till följd av att inte ta hänsyn till nitrifikation vid bedömning av bionedbrytbarheten hos testämnen, som inte innehåller N, är minimal (högst 5 %) även om oxidationen av mediets innehåll av ammonium-N sker sporadiskt från testprovet till blindprovet. För testämnen som innehåller N kan dock väsentliga fel uppstå.

Om ofullständig nitrifikation sker kan reaktionsblandningens iakttagna syreupptagning korrigeras för den syremängd som har förbrukats för oxidation av ammonium till nitrit och nitrat om ändringarna i nitrit- och nitrat-koncentrationen under inkuberingen bestäms med hänsyn tagen till följande reaktionsutjämningar:

$$2NH_4C1 + 3\ O_2 = 2\ HNO_2 + 2\ HC1 + 2\ H_2O \quad (1)$$

$$2\ HNO_2 + O_2 = 2\ HNO_3 \quad (2)$$

brutto:

$$2\ NH_4Cl + 4\ O_2 = 2\ HNO_3 + 2\ HCl + 2\ H_2O \quad (3)$$

Från ekvation (1) blir syreupptagningen vid oxidation av 28 g kväve i form av ammoniumklorid (NH_4C1) till nitrit 96 g, dvs. en faktor av 3,43 (96/28). På motsvarande sätt blir syreupptagningen vid oxidation av 28 g kväve till nitrat (3) 128 g, dvs. en faktor av 4,57 (128/28).

Eftersom reaktionerna är *sekvensiella,* då de sker på grund av deras individuella bakteriearter, kan nitratkoncentrationen öka eller minska. I det sistnämnda fallet kommer en ekvivalent mängd nitrat att bildas. Till följd av detta blir syreförbrukningen vid nitratbildning 4,57 gånger ökningen i nitratkoncentrationen, men den syremängd som är involverad i nitritbildningen blir dock 3,43 gånger ökningen av nitritkoncentrationen, eller vid en minskning av nitritkoncentrationen, en syreförlust av -3,43 gånger koncentrationsminskningen.

Dvs.

O_2-förbrukningen vid nitratbildning = 4,57 × N-nitratkoncentrationsökningen (4)

och

O_2-förbrukningen vid nitritbildning = 3,43 × N-nitritkoncentrationsökningen (5)

och

O_2-förlusten vid nitritförsvinnande = -3,43 × N-nitritkoncentrationsminskningen (6)

och därför blir

O_2-förbrukningen till nitrifikation = ±3,43 × N-nitntkoncentrationsändringen + 4,57 × N-nitratkoncentrationsökningen (7)

och därmed

O_2-förbrukningen till C-oxidation = total iakttagen förbrukning – förbrukning till nitrifikation (8)

Alternativt kan syreupptagningen till följd av nitrifikation som en första uppskattning sättas till 4,57 × tillväxten av oxiderat N, om endast totalt oxiderat N bestäms.

Det korrigerade värdet för syreförbrukningen till C-oxidation jämförs sedan med ThOD NH_3, beräknat enligt bilaga II.

▼B

C.5 NEDBRYTNING – BIOKEMISK SYREFÖRBRUKNING

1. METOD

1.1 INLEDNING

Syftet med denna metod är att mäta den biokemiska syreförbrukningen (BOD) för fasta eller flytande organiska ämnen.

Data som erhålls vid detta test avser vattenlösliga föreningar. Dock kan, åtminstone principiellt, även flyktiga föreningar undersökas.

Metoden kan endast tillämpas pä organiska testämnen som vid de koncentrationer som används i testet inte inverkar hämmande på bakterier. Om testämnet inte är lösligt vid testkoncentrationen kan det vara nödvändigt att vidta särskilda åtgärder, t.ex. att använda ultraljudsdispersion, för att uppnå en god dispersion av testämnet.

Uppgifter om testämnets toxicitet för mikroorganismer kan vara till nytta vid tolkningen av låga resultat och vid valet av lämpliga testkoncentrationer.

1.2 DEFINITIONER OCH ENHETER

BOD definieras som den mängd upplöst syre som krävs för den biokemiska oxideringsprocessen för en angiven mängd lösning av testämnet under testbetingelser.

Resultaten uttrycks som gram BOD per gram testat ämne.

1.3 REFERENSÄMNEN

Det är önskvärt att lämpligt kontrollämne används för att kontrollera inokulatets aktivitet.

1.4 TESTMETODSPRINCIP

En förbestämd mängd av ämnet, upplöst eller dispergerat i ett väl syrsatt medium, inokuleras med mikroorganismer och inkuberas i mörker vid en konstant, definierad passande temperatur.

BOD bestäms genom skillnaden mellan mängden upplöst syre i början och i slutet av testet. Testet ska pågå i minst fem dagar och högst 28 dagar.

Parallellt med testet ska utföras ett blindprov utan innehåll av testämnet.

1.5 KVALITETSKRITERIER

BOD-bestämningen kan inte anses vara en giltig bestämning av ett ämnes bionedbrytbarhet. Detta test kan endast betraktas som ett screenmg-test.

1.6 METODBESKRIVNING

En preliminär lösning eller dispersion av ämnet förbereds för att uppnå en BOD-koncentration som är förenlig med den använda metoden. BOD bestäms därefter enligt lämplig nationell eller internationell standardmetod.

▼B

2. **DATA OCH UTVÄRDERING**

BOD-innehållet i lösningen beräknas enligt den valda standardmetoden och omvandlas till gram BOD per gram testat ämne.

3. **RAPPORTERING**

Den använda metoden ska anges.

Den biokemiska syreförbrukningen ska vara ett medeltal av minst tre giltiga mätningar.

Alla uppgifter och upplysningar som är av betydelse för tolkningen av resultaten ska rapporteras, särskilt avseende ämnets sammansättning, orenheter, fysiskt tillstånd och toxiska effekter som kan påverka resultaten.

Eventuella tillsatser som använts för att hämma biologisk nitrifikation ska rapporteras.

4. HÄNVISNINGAR

Lista över standardiserade metoder, t.ex.:

NF T 90-103: Determination of the biochemical oxygen demand.

NBN 407: Biochemical oxygen demand.

NEN 3235 5.4: Bepaling van het biochemish 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 NEDBRYTNING – KEMISK SYREFÖRBRUKNING

1. METOD

1.1 INLEDNING

Syftet med denna metod är att mäta den kemiska syreförbrukningen (COD) för fasta eller flytande organiska ämnen på ett godtyckligt standardsätt under givna laboratoriebetingelser.

Uppgifter om ämnets formel är till nytta vid utförandet av testet och tolkningen av resultaten (t.ex. halogensalter, ferrosalter av organiska föreningar, organiska klorföreningar).

1.2 DEFINITIONER OCH ENHETER

Den kemiska syreförbrukningen är ett mått på ett ämnes förmåga att oxideras, uttryckt som den ekvivalenta mängden syre i en oxiderande reagens som förbrukas av ämnet under givna laboratoriebetingelser.

Resultatet uttrycks i gram COD per gram testat ämne.

1.3 REFERENSÄMNEN

Referensämnen behöver inte användas i samtliga fall när ett nytt ämne ska undersökas. Referensämnen ska först och främst användas till att emellanåt kalibrera metoden och till att möjliggöra en jämförelse av resultaten när en annan metod tillämpas.

1.4 TESTMETODSPRINCIP

En förbestämd mängd av ämnet, upplöst eller dispergerat i vatten, oxideras av kaliumbikromat i ett starkt svavelsyremedium med silversulfat som katalysator under återflöde i två timmar. Restmängden bikromat bestäms genom titrering med standard järnammoniumsulfat.

Vid klorhaltiga ämnen tillsätts kvicksilversulfat ([1]) för att reducera inverkan av klor.

1.5 KVALITETSKRITERIER

Till följd av det godtyckliga sättet att bestämma COD ska resultatet mera betraktas som en ”indikator på oxideringsförmågan” än som ett mått på mängden organiskt ämne.

Klorid kan inverka på detta test. Oorganiska reducerande eller oxiderande ämnen kan också inverka på BOD-bestämningen.

Vissa cykliska föreningar oxideras inte till fullo vid detta test.

1.6 METODBESKRIVNING

En inledande lösning eller dispersion av ämnet bereds så att ett COD mellan 250 och 600 mg per liter erhålls.

([1]) Efter användning ska lösningar som innehåller kvicksilversalt behandlas för att undvika spridning av kvicksilver i miljön.

▼B

Anmärkningar:

Vid svårlösliga ämnen och ämnen som inte dispergerar kan finpulvriserat eller flytande ämne motsvarande ungefär 5 mg COD överföras till försöksapparaten tillsammans med vatten.

Den kemiska syreförbrukningen (COD) bestäms ofta, och särskilt för svårlösliga ämnen, i förväg med en variant av metoden, nämligen ett slutet system med tryckutjämning (H. Kelkenberg, 1975). Med denna modifikation kan det ofta med framgång företas kvantitativ bestämning av föreningar som endast med svårighet kan bestämmas genom konventionella metoder, t.ex. ättiksyra. Metoden duger dock inte för pyridin. Ökning av kaliumdikromatkoncentrationen till 0,25 N (0,0416 M) i enlighet med hänvisning 1 kan underlätta den direkta invägningen av 5–10 mg ämne, vilket är ett villkor för COD-bestämning på ämnen som är svårlösliga i vatten (hänvisning 2).

För övrig bestäms COD därefter med hjälp av en lämplig nationell eller internationell standardmetod.

2. **DATA OCH UTVÄRDERING**

COD-innehållet i testkolven beräknas enligt den valda standardmetoden och omvandlas till gram COD per gram testat ämne.

3. **RAPPORTERING**

Den använda referensmetoden ska anges.

Den kemiska syreförbrukningen ska vara ett medeltal av minst tre mätningar. Alla uppgifter och upplysningar som är av betydelse för tolkningen av resultaten ska rapporteras, särskilt avseende orenheter, ämnets fysiska tillstånd och egenskaper (om de är kända) som kan påverka resultaten.

Om kvicksilversulfat har använts för att minimera inverkan av klor ska detta rapporteras.

4. **HÄNVISNINGAR**

1. Kelkenberg, H. Z., von Wasser und Abwasserforschung, 1975, vol. 8., s. 146.

2. Gerike, P. The biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, vol. 13, s. 169.

Lista över standardiserade metoder, t.ex.:

NBN T 91-201: Determination of the oxygen demand.

ISBN O 11 7512494: Chemical oxygen demand (dichromate value) of polluted and waste waters.

NTF 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 **Nedbrytning – ABIOTISK NEDBRYTNING: Hydrolys som funktion av pH**

1. **METOD**

Denna testmetod motsvarar OECD TG 111 (2004).

1.1 INLEDNING

Kemikalier kan nå ytvatten genom direktutsläpp, vindavdrift, avrinning, dränering, avfallsdeponering, avloppsvatten från industrier, hushåll eller jordbruk och genom atmosfärisk deposition, och de kan där omvandlas genom kemiska (t.ex. hydrolys, oxidation), fotokemiska och mikrobiella processer. I denna riktlinje beskrivs en testmetod för bedömning av abiotisk hydrolytisk omvandling av kemikalier i akvatiska system vid pH-värden som normalt förekommer i miljön (pH 4–9). Riktlinjen grundar sig på nuvarande riktlinjer (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7).

Försöken utförs för att fastställa dels i) testsubstansens hydrolyshastighet som funktion av pH, dels ii) vilken typ av hydrolysprodukter som organismer kan exponeras för samt dessas bildnings- och nedbrytningshastighet. Sådana studier kan vara nödvändiga för kemikalier som släpps ut direkt i vatten eller som kan komma att nå miljön genom de andra vägar som nämns ovan.

1.2 DEFINITIONER OCH ENHETER

Se bilaga 2.

1.3 METODENS ANVÄNDBARHET

Metoden kan generellt användas för kemiska ämnen (omärkta eller märkta) för vilka det finns en tillräckligt noggrann och känslig analysmetod. Den kan användas för halvflyktiga och ickeflyktiga ämnen som är tillräckligt vattenlösliga. Testet bör inte användas för kemikalier som är lättflyktiga från vatten (t.ex. gasningsmedel, organiska lösningsmedel) och som därför inte kan hållas i lösning under de förhållanden som råder under testet. Testet kan vara svårt att utföra med ämnen som har mycket låg löslighet i vatten (8).

1.4 PRINCIP FÖR TESTMETODEN

Sterila vattenbaserade buffertlösningar med olika pH-värde (pH 4, 7 och 9) behandlas med testsubstansen och inkuberas i mörker under kontrollerade försöksbetingelser (vid konstant temperatur). Med lämpliga tidsintervall bestäms halterna av testsubstansen och hydrolysprodukter i buffertlösningarna. Om testsubstansen är märkt (t.ex. med ^{14}C) så blir det lättare att upprätta en massbalans.

I testet används en stegvis metod som visas och förklaras i bilaga 1. Varje teststeg utlöses av resultaten från föregående steg.

▼B

1.5 INFORMATION OM TESTSUBSTANSEN

Omärkta eller märkta testsubstanser kan användas vid mätning av hydrolyshastigheten. Märkt material är i regel att föredra vid studier av reaktionsvägar och för att upprätta massbalans. I vissa speciella fall är dock märkning inte helt nödvändig. ^{14}C-märkning rekommenderas, men andra isotoper, t.ex. ^{13}C, ^{15}N, ^{3}H, kan också vara användbara. Om möjligt bör märkningen placeras i molekylens mest stabila del(ar). Om det undersökta ämnet exempelvis innehåller en ring så ska märkningen sitta på denna ring. Om ämnet innehåller två eller flera ringar kan det krävas särskilda studier för att utvärdera vad som händer med varje enskild märkt ring och för att få mer information om bildningen av hydrolysprodukter. Testsubstansens renhet bör vara minst 95 %.

Innan ett hydrolystest utförs ska följande uppgifter om testsubstansen finnas tillgängliga:

a) Löslighet i vatten (testmetod A.6)

b) Löslighet i organiska lösningsmedel

c) Ångtryck (testmetod A.4) och/eller Henrys konstant

d) Fördelningskoefficient n-oktanol/vatten (testmetod A.8)

e) Dissociationskonstant (pK_a) (OECD:s riktlinje 112) (9)

f) Nedbrytningshastighet vid direkt och indirekt fotolys i vatten, i tillämpliga fall

Analysmetoder för kvantifiering av testsubstansen och, om så behövs, för identifiering och kvantifiering av hydrolysprodukter i vattenlösningar ska finnas tillgängliga (se även avsnitt 1.7.2).

1.6 REFERENSSUBSTANSER

Om möjligt bör referenskemikalier användas för att identifiera och kvantifiera hydrolysprodukter med hjälp av spektroskopiska och kromatografiska metoder eller andra metoder med lämplig känslighet.

1.7 KVALITETSKRITERIER

1.7.1 **Utbyte**

Analys av minst två identiska prov med buffertlösning eller extrakt av dessa omedelbart efter tillsättning av testsubstansen ger en första indikation på analysmetodens repeterbarhet och på hur enhetligt sättet att tillföra testsubstansen är. Under försökens senare steg erhålls uppgifter om utbyte med hjälp av respektive massbalanser (om märkta material används). Utbytet bör ligga mellan 90 och 110 % för märkta och omärkta kemikalier (7). Om det är tekniskt svårt att få så högt utbyte så kan ett utbyte på 70 % godtas för omärkta kemikalier, men i så fall bör motivering ges.

▼B

1.7.2 **Analysmetodens repeterbarhet och känslighet**

Repeterbarheten hos de analysmetoder som används för att kvantifiera testsubstansen och hydrolysprodukterna i senare skeden kan bestämmas genom analys av dubbelprover av samma buffertlösningar (eller extrakt av dessa) efter det att hydrolysprodukter har bildats i tillräckliga mängder för kvantifiering.

Analysmetoden bör vara så känslig att det är möjligt att kvantifiera testsubstansen i koncentrationer som är högst 10 % av den ursprungliga koncentrationen. I tillämpliga fall bör analysmetoderna också vara så känsliga att det är möjligt att kvantifiera hydrolysprodukter som motsvarar minst 10 % av tillsatsen (i varje skede av undersökningen) och ned till högst 25 % av den högsta koncentrationen.

1.7.3 **Konfidensintervall för kinetiska data för hydrolysen**

Konfidensintervall ska beräknas och redovisas för alla regressionskoefficienter, hastighetskonstanter, halveringstider och andra kinetiska parametrar (t.ex. DT50).

1.8 BESKRIVNING AV TESTMETODEN

1.8.1 **Utrustning**

Försöken bör göras i glaskärl (t.ex. provrör eller små kolvar) under mörka och sterila förhållanden om så krävs. Undantag görs om förhandsuppgifter (exempelvis fördelningskoefficienten n-oktanol/vatten) indikerar att testsubstansen kan fastna på glas. I sådana fall bör ett alternativt material (till exempel teflon) övervägas. Problemet med vidhäftning till glas kan eventuellt avhjälpas med en eller flera av följande metoder:

— Bestämning av den massa av testsubstans och hydrolysprodukter som fastnar på provkärlet.

— Användning av ultraljudsbad.

— Alla glaskärl tvättas med lösningsmedel vid varje provtagningsintervall.

— Användning av bruksfärdiga produkter.

— Användning av en större mängd hjälplösningsmedel för tillförsel av testsubstansen till systemet – hjälplösningsmedlet får dock inte leda till hydrolys av testsubstansen.

Temperaturreglerade skakvattenbad eller termostatreglerade inkubatorer för inkubation av de olika testlösningarna krävs i normala fall.

Normal laboratorieutrustning krävs, och särskilt följande:

— pH-mätare.

▼B

— Analysinstrument såsom gaskromatograf, vätskekromatograf och utrustning för tunnskiktskromatografi samt lämpliga detektionssystem för analys av radioaktivt märkta och omärkta ämnen eller metod för isotoputspädning.

— Instrument för identifiering, t.ex. masspektrometer, gaskromatograf-masspektrometer, vätskekromatograf-masspektrometer, NMR-spektrometer.

— Vätskescintillationsräknare.

— Separertrattar för vätske-vätskeextraktion.

— Instrument för att koncentrera lösningar och extrakt (t.ex. rotationsevaporator).

— Utrustning för temperaturreglering (t.ex. vattenbad).

Kemiska reagens, exempelvis följande:

— Organiska lösningsmedel av analytisk renhetsgrad (p.a.), t.ex. hexan, diklormetan.

— Scintillationsvätska.

— Buffertlösningar (för närmare uppgifter se avsnitt 1.8.3).

Alla glaskärl, vatten av analytisk renhetsgrad (p.a.) och buffertlösningar som används i hydrolystestet bör vara sterila.

1.8.2 **Tillförsel av testsubstans**

Testsubstansen tillförs de olika buffertlösningarna i form av vattenlösning (se bilaga 3). För att underlätta upplösningen kan om så krävs små mängder lösningsmedel som är blandbara med vatten (såsom acetonitril, aceton eller etanol) tillåtas för tillförsel och fördelning av testsubstansen. Koncentrationen bör dock i normala fall inte överskrida en volymprocent. Högre koncentrationer av lösningsmedel (t.ex. när det gäller svårlösliga testsubstanser) kan tillåtas endast om det kan visas att lösningsmedlet inte påverkar hydrolysen av testsubstanserna.

Bruksfärdiga produkter bör inte användas rutinmässigt eftersom det inte kan uteslutas att de ingående beståndsdelarna kan påverka hydrolysprocessen. För testsubstanser som är svårlösliga i vatten eller binder till glas kan dock bruksfärdiga lösningar vara ett lämpligt alternativ.

En och samma koncentration av testsubstansen ska användas, och den bör inte överskrida 0,01 M eller halva mättnadskoncentrationen (se bilaga 1).

▼B

1.8.3 **Buffertlösningar**

Hydrolystestet utförs vid pH-värdena 4, 7 och 9. Buffertlösningar för testet bereds av kemikalier och vatten av analytisk renhetsgrad (p.a.). Några användbara buffertsystem beskrivs i bilaga 3. Det bör noteras att hydrolyshastigheten kan påverkas av det buffertsystem som används. Om sådan påverkan observeras bör ett alternativt buffertsystem användas ([1]).

I varje buffertlösning bör pH kontrolleras med en kalibrerad pH-mätare med en noggrannhet på ± 0,1 eller bättre vid relevant temperatur.

1.8.4 **Testförhållanden**

1.8.4.1 *Testtemperatur*

Hydrolysförsöken ska utföras vid konstanta temperaturer. För extrapolering är det viktigt att temperaturen inte varierar mer än ± 0,5 °C.

Ett inledande test (steg 1) utförs vid 50 °C om testsubstansens hydrolysegenskaper inte är kända. Kinetiska test i senare steg utförs vid minst tre temperaturer (inbegripet testet vid 50 °C) om inte testet i steg 1 visar att testsubstansen är stabil mot hydrolys. Förslagsvis görs testen i temperaturintervallet 10–70 °C (helst minst en temperatur under 25 °C), vilket omfattar rapporteringstemperaturen 25 °C och de flesta temperaturer som förekommer i miljön.

1.8.4.2 *Ljus och syre*

Alla hydrolystest bör utföras med en lämplig metod för att undvika fotolys. Alla lämpliga åtgärder bör vidtas för att avlägsna syrgas (t.ex. att bubbla med helium, kvävgas eller argon i fem minuter innan lösningen bereds.)

1.8.4.3 *Testets varaktighet*

Det inledande testet bör pågå i fem dagar, medan testen i senare steg bör pågå tills 90 % av testsubstansen är hydrolyserad, dock inte längre än 30 dagar.

1.8.5 **Testets utförande**

1.8.5.1 *Inledande test (steg 1)*

Det inledande testet utförs vid 50 ± 0,5 °C och pH 4,0, 7,0 och 9,0. Om mindre än 10 % av hydrolysen har skett efter fem dagar ($t_{0,5}$ 25 °C > 1 år) så bedöms testsubstansen vara hydrolytiskt stabil och i normala fall krävs inga fortsatta tester. Om det är känt att ämnet är instabilt vid normala omgivningstemperaturer ([2]) så krävs inget inledande test. Analysmetoden måste ha tillräcklig precision och känslighet för att kunna påvisa en tioprocentig minskning av ursprungskoncentrationen.

([1]) Mabey och Mill rekommenderar borat- eller acetatbuffert i stället för fosfatbuffert (11).

([2]) Sådan information kan komma från andra källor, såsom litteraturuppgifter om hydrolys av strukturellt likartade föreningar, eller från andra preliminära, semikvantitativa hydrolystest med testsubstansen på ett tidigare utvecklingsstadium.

▼B

1.8.5.2 *Hydrolys av instabila ämnen (steg 2)*

Testet i steg 2 utförs vid de pH-värden där testsubstansen var instabil enligt det inledande testet. Buffertlösningar av testsubstansen hålls vid de valda temperaturerna med hjälp av termostat. Vid test av reaktioner av första ordningen analyseras varje testlösning med tidsintervall som ger minst sex datapunkter som i normala fall är jämnt fördelade mellan 10 och 90 % hydrolys av testsubstansen. Individuella dubbelprov (minst två replikat, i separata reaktionskärl) tas ut och innehållet analyseras vid minst sex provtagningstillfällen (för att få minst tolv replikat av datapunkter). Det bedöms vara olämpligt att använda ett enda bulkprov från vilket enskilda alikvoter av testlösningen tas ut vid varje provtagningsintervall, eftersom detta förfarande inte gör det möjligt att analysera variationen i data och det dessutom kan medföra problem med kontaminering av testlösningen. Test för att bekräfta sterilitet bör utföras i slutet av steg 2 (dvs. vid 90 % hydrolys eller 30 dagar). Om ingen nedbrytning (dvs. omvandling) observeras behöver dock inga sterilitetstest göras.

1.8.5.3 *Identifiering av hydrolysprodukter (steg 3)*

Alla viktiga hydrolysprodukter, åtminstone de som motsvarar > 10 % av den tillförda dosen, bör identifieras med lämpliga analysmetoder.

1.8.5.4 *Valfria test*

Ytterligare test vid andra pH-värden än 4, 7 och 9 kan vara nödvändiga för hydrolytiskt instabila testsubstanser. Exempelvis kan det, för fysiologiska ändamål, vara nödvändigt att göra ett test vid surare förhållanden (t.ex. pH 1,2) och vid en enda fysiologiskt relevant temperatur (37 ^{o}C).

2. **DATA**

Mängderna av testsubstans och eventuella hydrolysprodukter bör anges i procent av den tillförda ursprungskoncentrationen eller om så är lämpligt i mg/l för varje provtagningsintervall och för varje pH-värde och testtemperatur. Dessutom bör en massbalans anges i procent av den tillförda ursprungskoncentrationen om en märkt testsubstans har använts.

Testsubstansens koncentration som funktion av tiden bör redovisas grafiskt med logaritmerade värden. Alla viktiga hydrolysprodukter, åtminstone de som motsvarar ≥ 10 % av den tillförda dosen, bör identifieras, och logaritmerade värden av deras koncentrationer bör redovisas grafiskt på samma sätt som för modersubstansen för att visa bildnings- och nedbrytningshastighet.

▼B

2.1 BEHANDLING AV RESULTATEN

Mer exakta bestämningar av halveringstiderna eller DT50 bör göras med hjälp av lämpliga kinetiska modeller. Halveringstid och DT50-värden (inklusive konfidensintervall) rapporteras för varje pH-värde och temperatur tillsammans med en beskrivning av den modell som använts, kinetisk ordningsgrad och bestämningskoefficient (r^2). Om så är lämpligt bör motsvarande beräkningar göras för hydrolysprodukterna.

Om hastigheterna undersöks vid olika temperaturer bör hastighetskonstanterna (kobs) för hydrolys av pseudoförsta ordningen beskrivas som funktion av temperaturen. Beräkningen bör grundas både på en uppdelning av kobs i hastighetskonstanter för syrakatalyserad, neutral och baskatalyserad hydrolys (k_H, $k_{neutral}$, respektive k_{OH}) och på Arrhenius ekvation:

$$k_{obs} = k_H[H^+] + k_{neutral} + k_{OH}[OH^-] = \sum_{i = H,neutral,OH} A_i e^{-B_i/T}$$

där A_i och B_i är regressionskonstanter från skärningspunkten respektive lutningen för en anpassad linje som har erhållits genom linjär regression av ln k_i mot det reciproka värdet av den absoluta temperaturen i Kelvin (T). Genom att använda Arrheniusrelationerna för syrakatalyserad, neutral och baskatalyserad hydrolys kan hastighetskonstanter av pseudo-första ordningen och därmed halveringstider beräknas för andra temperaturer för vilka en direkt experimentell bestämning av hastighetskonstanten inte är praktiskt genomförbar (10).

2.2 UTVÄRDERING OCH TOLKNING AV RESULTATEN

I de flesta hydrolysreaktioner är reaktionshastigheterna uppenbart av första ordningen och halveringstiderna är därför oberoende av koncentrationen (se ekvation 4 i bilaga 2). Detta innebär att laboratorieresultat som bestämts vid 10^{-2} till 10^{-3} M i allmänhet kan tillämpas på de förhållanden som råder i miljön ($\leq 10^{-6}$ M) (10). Mabey och Mill (11) har rapporterat flera exempel på god överensstämmelse mellan hydrolyshastigheter uppmätta i både rena och naturliga vatten för ett stort antal kemikalier, förutsatt att både pH och temperatur hade mätts.

3. **RAPPORTERING**

3.1 TESTRAPPORT

Testrapporten ska innehålla åtminstone följande information:

Testsubstans:

— Trivialnamn, kemiskt namn, CAS-nummer, strukturformel (med angivelse av märkningsposition om radioaktivt märkt material används) och relevanta fysikaliskkemiska egenskaper (se avsnitt 1.5).

— Testsubstansens renhet och eventuella föroreningar.

— Renhet och aktivitet per mol hos den isotop som används för märkning (i tillämpliga fall).

▼B

— Buffertlösningar.

— Beredningsdag och andra uppgifter om beredningen.

— Typ av buffertar och vatten.

— Buffertlösningarnas molaritet och pH.

Testförhållanden:

— Försöksdag.

— Mängd tillförd testsubstans.

— Metod och lösningsmedel (typ och mängd) för tillförsel av testsubstansen.

— Inkuberad volym av buffertlösning med testsubstans.

— Beskrivning av inkubationssystemet.

— pH och temperatur under försöket.

— Provtagningstidpunkter.

— Extraktionsmetod(er).

— Metoder för kvantifiering och identifiering av testsubstansen och hydrolysprodukter i buffertlösningarna.

— Antal replikat.

Resultat:

— Analysmetodernas repeterbarhet och känslighet.

— Utbyten (procentvärden för en godtagbar undersökning anges i avsnitt 1.7.1).

— Tabeller över data och medelvärden för replikat.

— Massbalans under och i slutet av försöken (om märkta testsubstanser används).

— Resultat av inledande test.

— Diskussion och tolkning av resultaten.

— Alla originaldata och siffror.

Följande uppgifter krävs endast om hydrolyshastigheten har bestämts:

— Diagram över koncentration som funktion av tiden för testsubstanserna och i tillämpliga fall för hydrolysprodukterna vid varje pH-värde och temperatur.

— Tabeller över resultaten av Arrhenius ekvation för temperaturen 20 °C/25 °C, med pH, hastighetskonstant [h^{-1} eller dag^{-1}], halveringstid eller DT_{50}, temperaturer (°C) inklusive konfidensintervall samt korrelationskoefficienter (r^2) eller motsvarande information.

— Föreslagna reaktionsvägar för hydrolysen.

▼B

4. **HÄNVISNINGAR**

1. OECD (1981), Hydrolysis as a Function of pH. OECD Guideline for Testing of Chemicals no 111, adopted 12 May 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. Europeiska unionen (EU) (1995), kommissionens direktiv 95/36/EG om ändring av rådets direktiv 91/414/EEG om utsläppande av växtskyddsmedel på marknaden. Bilaga V: Omvandling, spridning och fördelning i miljön.

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, Ed.

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.

9. OECD (1993), Guidelines for the Testing of Chemicals. Paris. OECD (1994–2000): Addenda 6–11 to Guidelines for the Testing of Chemicals.

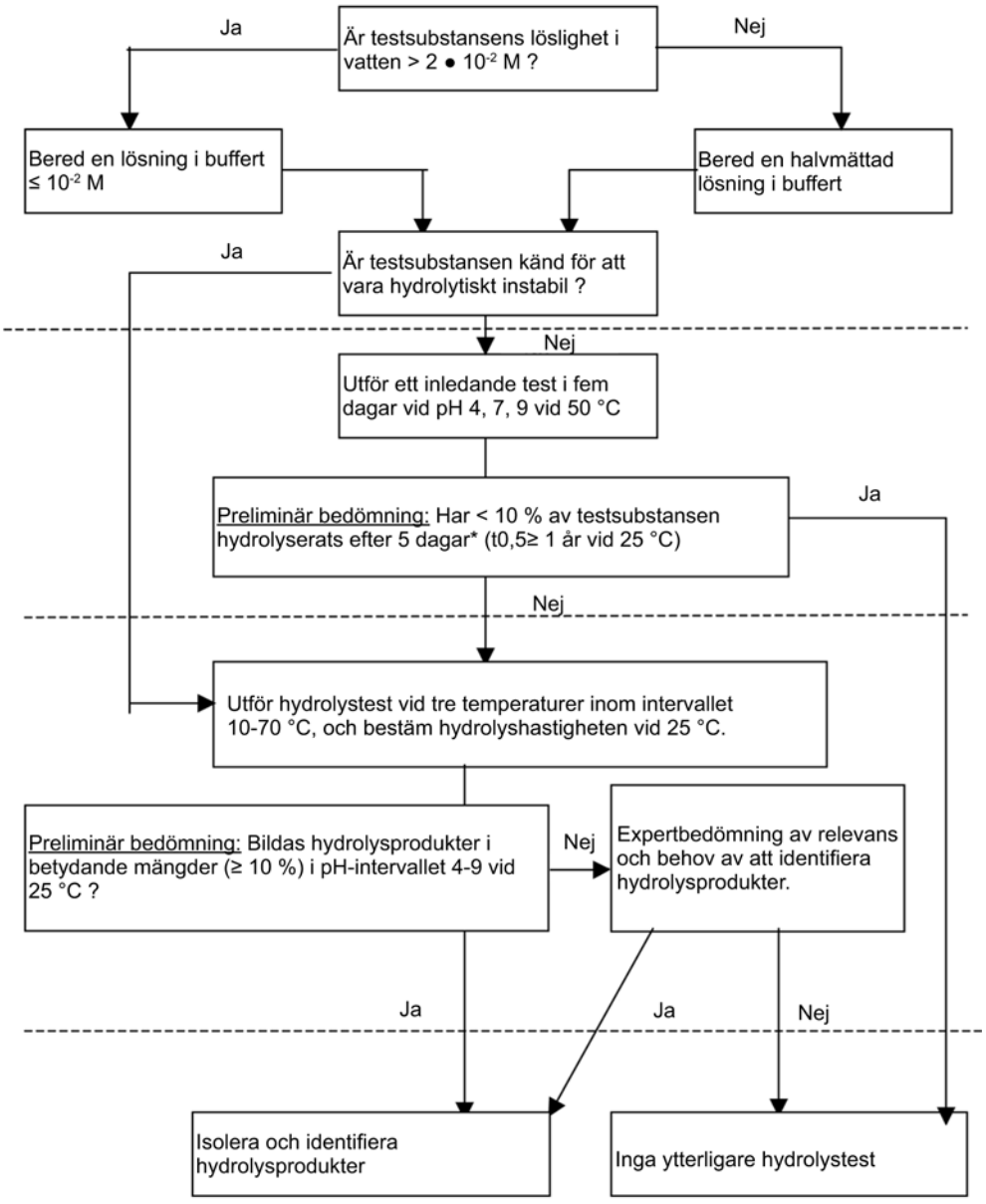
10. Nelson, H, Laskowski D, Thermes S., and Hendley P. (1997), Recommended changes in pesticide fate study guidelines for improving input to computer models. (Text version of oral presentation at the 14th Annual Meeting of the Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Dallas TX, november 1993).

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

Bilaga 1

Översikt över hydrolystestets olika steg



* 10 % hydrolys av en testsubstans vid 50 °C motsvarar en halveringstid på ungefär 30 dagar, vilket motsvarar ungefär ett år vid 25 °C.

▼B

Bilaga 2

Definitioner och enheter

SI-enheter ska alltid användas.

testsubstans: alla ämnen, oavsett om det gäller den ursprungliga föreningen eller relevanta omvandlingsprodukter.

omvandlingsprodukter: omvandlingsprodukter: alla ämnen som uppstår till följd av biotiska eller abiotiska omvandlingsreaktioner av testsubstansen.

hydrolysprodukter: alla ämnen som uppstår till följd av hydrolytiska omvandlingsreaktioner av testsubstansen.

hydrolys: en testsubstans RX reagerar med vatten varvid slutresultatet blir att gruppen X byts ut mot OH.

$$RX + HOH \rightarrow ROH + HX \qquad [1]$$

I denna förenklade process minskar koncentrationen av RX med en hastighet enligt formeln

hastighet = $k\ [H_2O]\ [RX]$ reaktion av andra ordningen

eller

hastighet = $k\ [RX]$ reaktion av första ordningen

beroende på det hastighetsbestämmande steget. Eftersom vatten finns i stort överskott jämfört med testsubstansen brukar denna typ av reaktion beskrivas som en reaktion av första ordningen där den observerade hastighetskonstanten erhålls genom förhållandet

$$k_{obs} = k\ [H_2O] \qquad [2]$$

och kan bestämmas med hjälp av uttrycket (*)

$$k_{obs} = \frac{1}{t} \ln \frac{C_o}{C_t} \qquad [3]$$

där

t = tiden

och C_0, C_t = koncentrationerna av RX vid tiderna 0 och t.

Enheten för denna konstant har dimensionen $(tid)^{-1}$ och reaktionens halveringstid (den tid det tar för 50 % av RX att reagera) erhålls genom

$$t_{0,5} = \frac{\ln 2}{k_{obs}} \qquad [4]$$

halveringstid: betecknas med ($t_{0,5}$) – den tid det tar för en testsubstans att hydrolyseras till 50 % när reaktionen kan beskrivas med kinetik av första ordningen; halveringstiden är oberoende av koncentrationen.

(*) Om diagrammet över logaritmerade data som funktion av tiden inte visar att funktionen är linjär (ekvivalent med en reaktionshastighet av första ordningen) så är ekvation 3 olämplig för att bestämma hastighetskonstanten för hydrolys av testsubstansen.

▼B

DT_{50} (Disappearance Time 50): Den tid inom vilken testsubstansens koncentration minskar med 50 %; den skiljer sig från halveringstiden $t_{0,5}$ om reaktionen inte följer en kinetik av första ordningen.

Uppskattning av k vid olika temperaturer

Om hastighetskonstanterna är kända för två temperaturer så kan hastighetskonstanterna vid andra temperaturer beräknas med hjälp av Arrhenius ekvation:

$$k = A \times e^{-\frac{E}{R \times T}} \text{ eller } \ln k = \frac{-E}{R \times T} + \ln A$$

Ett diagram över ln k som funktion av 1/T ger en rät linje med lutningen -E/R

där

k = hastighetskonstanten mätt vid olika temperaturer

E = aktiveringsenergin [kJ/mol]

T = absolut temperatur [K]

R = gaskonstanten [8,314 J/mol· K]

Aktiveringsenergin beräknas genom regressionsanalys eller följande ekvation:

$$E = R \times \frac{\ln k_2 - \ln k_1}{\left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2}\right)}$$

där $T_2 > T_1$.

▼B

Bilaga 3

Buffertsystem

A. **CLARK OCH LUBS:**

Buffertblandningar enligt CLARK och LUBS (*)

Sammansättning	pH
0,2 N HCl OCH 0,2 N KCl VID 20 °C	
47,5 ml HCl + 25 ml KCl utspätt till 100 ml	1,0
32,25 ml HCl + 25 ml KCl utspätt till 100 ml	1,2
20,75 ml HCl + 25 ml KCl utspätt till 100 ml	1,4
13,15 ml HCl + 25 ml KCl utspätt till 100 ml	1,6
8,3 ml HCl + 25 ml KCl utspätt till 100 ml	1,8
5,3 ml HCl + 25 ml KCl utspätt till 100 ml	2,0
3,35 ml HCl + 25 ml KCl utspätt till 100 ml	2,2
0,1 M kaliumbiftalat + 0,1 N HCl vid 20 °C	
46,70 ml 0,1 N HCl + 50 ml biftalat utspätt till 100 ml	2,2
39,60 ml 0,1 N HCl + 50 ml biftalat utspätt till 100 ml	2,4
32,95 ml 0,1 N HCl + 50 ml biftalat utspätt till 100 ml	2,6
26,42 ml 0,1 N HCl + 50 ml biftalat utspätt till 100 ml	2,8
20,32 ml 0,1 N HCl + 50 ml biftalat utspätt till 100 ml	3,0
14,70 ml 0,1 N HCl + 50 ml biftalat utspätt till 100 ml	3,2
9,90 ml 0,1 N HCl + 50 ml biftalat utspätt till 100 ml	3,4
5,97 ml 0,1 N HCl + 50 ml biftalat utspätt till 100 ml	3,6
2,63 ml 0,1 N HCl + 50 ml biftalat utspätt till 100 ml	3,8
0,1 M kaliumbiftalat + 0,1 N NaOH vid 20 °C	
0,40 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalat utspätt till 100 ml	4,0
3,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalat utspätt till 100 ml	4,2
7,50 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalat utspätt till 100 ml	4,4
12,15 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalat utspätt till 100 ml	4,6
17,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalat utspätt till 100 ml	4,8

(*) De pH-värden som anges i dessa tabeller har beräknats från de potentiella mätningarna med hjälp av Sörensens standardekvationer (1909). Motsvarande pH-värden är 0,04 enheter högre än tabellvärdena.

▼B

Sammansättning	pH
23,85 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalat utspätt till 100 ml	5,0
29,95 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalat utspätt till 100 ml	5,2
35,45 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalat utspätt till 100 ml	5,4
39,85 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalat utspätt till 100 ml	5,6
43,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalat utspätt till 100 ml	5,8
45,45 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalat utspätt till 100 ml	6,0

Buffertblandningar enligt CLARK och LUBS (fortsättning)

0,1 M monokaliumfosfat + 0,1 N NaOH vid 20 °C	
5,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfat utspätt till 100 ml	6,0
8,60 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfat utspätt till 100 ml	6,2
12,60 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfat utspätt till 100 ml	6,4
17,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfat utspätt till 100 ml	6,6
23,45 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfat utspätt till 100 ml	6,8
29,63 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfat utspätt till 100 ml	7,0
35,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfat utspätt till 100 ml	7,2
39,50 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfat utspätt till 100 ml	7,4
42,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfat utspätt till 100 ml	7,6
45,20 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfat utspätt till 100 ml	7,8
46,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfat utspätt till 100 ml	8,0
0,1 M H_3BO_3 i 0,1 M KCl +0,1 N NaOH vid 20 °C	
2,61 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borsyra utspätt till 100 ml	7,8
3,97 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borsyra utspätt till 100 ml	8,0
5,90 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borsyra utspätt till 100 ml	8,2
8,50 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borsyra utspätt till 100 ml	8,4
12,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borsyra utspätt till 100 ml	8,6
16,30 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borsyra utspätt till 100 ml	8,8
21,30 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borsyra utspätt till 100 ml	9,0
26,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borsyra utspätt till 100 ml	9,2

▼B

32,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borsyra utspätt till 100 ml	9,4
36,85 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borsyra utspätt till 100 ml	9,6
40,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borsyra utspätt till 100 ml	9,8
43,90 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borsyra utspätt till 100 ml	10,0

B. **KOLTHOFF OCH VLEESCHHOUWER:**

Citratbuffertar enligt KOLTHOFF och VLEESCHHOUWER

Sammansättning	pH
0,1 M monokaliumfosfat och 0,1 N HCl vid 18 °C (*)	
49,7 ml 0,1 N HCl + 50 ml citrat utspätt till 100 ml	2,2
43,4 ml 0,1 N HCl + 50 ml citrat utspätt till 100 ml	2,4
36,8 ml 0,1 N HCl + 50 ml citrat utspätt till 100 ml	2,6
30,2 ml 0,1 N HCl + 50 ml citrat utspätt till 100 ml	2,8
23,6 ml 0,1 N HCl + 50 ml citrat utspätt till 100 ml	3,0
17,2 ml 0,1 N HCl + 50 ml citrat utspätt till 100 ml	3,2
10,7 ml 0,1 N HCl + 50 ml citrat utspätt till 100 ml	3,4
4,2 ml 0,1 N HCl + 50 ml citrat utspätt till 100 ml	3,6
0,1 M monokaliumfostat och 0,1 N NaOH vid 18 °C (*)	
2,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrat utspätt till 100 ml	3,8
9,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrat utspätt till 100 ml	4,0
16,3 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrat utspätt till 100 ml	4,2
23,7 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrat utspätt till 100 ml	4,4
31,5 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrat utspätt till 100 ml	4,6
39,2 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrat utspätt till 100 ml	4,8
46,7 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrat utspätt till 100 ml	5,0
54,2 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrat utspätt till 100 ml	5,2
61,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrat utspätt till 100 ml	5,4
68,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrat utspätt till 100 ml	5,6
74,4 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrat utspätt till 100 ml	5,8
81,2 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrat utspätt till 100 ml	6,0

(*) Tillsätt en liten kristall tymol eller liknande ämne för att förhindra svampangrepp.

▼B

C. **SÖRENSEN:**

Boratblandningar enligt SÖRENSEN

Sammansättning		Sörensen 18 °C	Walbum, pH vid		
ml borax	ml HCl/NaO H		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

Fosfatblandningar enligt SÖRENSEN

Sammansättning	pH
0,0667 M monokaliumfosfat + 0,0667 M dinatriumfosfat vid 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 **TOXICITET HOS DAGGMASKAR**

TEST I SYNTETISK JORD

1. **METOD**

1.1 INLEDNING

Vid detta laboratorietest tillsätts testämnet till syntetisk jord i vilken daggmaskar placeras i 14 dagar. Efter denna period (alternativt efter sju dagar) undersöks ämnetd dödliga verkan på daggmaskarna. Detta test är en metod för att under en relativt kort tid undersöka kemikaliers verkan på daggmaskar vid upptagning genom huden eller via fodret.

1.2 DEFINITIONER OCH ENHETER

LC_{50}: Koncentrationen av ett ämne som kan förväntas orsaka att 50 % av försöksdjuren dör under testperioden.

1.3 REFERENSÄMNE

En referensämne används regelbundet för att visa att testsystemets känslighet inte har ändrats signifikant.

Som referensämne rekommenderas analytiskt rent kloracetamid.

1.4 TESTMETODSPRINCIP

Eftersom jord är ett variabelt medium används en noggrant definierad syntetisk lerjord för detta test. Vuxna daggmaskar av arten *Eisenia foetida* (se anmärkningen i tillägget) hålls i en definierad syntetisk jord som behandlats med olika koncentrationer av testämnet. Behållarnas innehåll sprids ut på en bricka 14 dagar (alternativt sju dagar) efter inledningen av testet och det antal daggmaskar som överlever vid varje koncentration räknas.

1.5 KVALITETSKRITERIER

Testet är beräknat att vara så reproducerbart som möjligt med hänsyn till testsubstrat och organism. Om dödligheten hos kontrolldjuren överstiger 10 % vid testets avslutning är testet ogiltigt.

1.6 METODBESKRIVNING

1.6.1 *Material*

1.6.1.1 Testsubstrat

Väldefinierad syntetisk jord används som bassubstrat.

a) Bassubstrat (viktprocent torrämne)

— 10 % sphagnum (så nära pH-värde 5,5–6 som möjligt utan synliga plantrester och finfördelat).

▼B

— 20 % kaolinhaltig lera, helst med över 50 % kaolinit.

— Cirka 69 % industriell kvartssand (övervägande finsand med över 50 % med en partikel storlek av 0,05–0,2 mm). Om testämnet inte är tillräckligt lätt uppslammad i vatten sätts 10 g per testbehållare åt sidan för senare blandning med testämnet.

— Cirka 1 % kalciumkarbonat ($CaCO_3$), pulvriserat, kemiskt rent, tillsatt för att få ett pH-värde av 6,0 ± 0,5.

b) Testsubstrat

Testsubstratet består av bassubstrat, testämne och avjoniserat vatten.

Vatteninnehållet motsvarar ca 25–42 viktprocent av bassubstratets torrvikt. Substratets vatteninnehåll bestäms genom torkning av ett prov till konstant vikt vid 105 °C. Ett viktigt kriterium är att den syntetiska jorden har fuktats så mycket det går, men det får inte finnas något stående vatten. Blandningen sker omedelbart så att det blir en jämn fördelning av testämnet och substratet. Den metod som används för att tillsätta testämnet till substratet ska rapporteras.

c) Kontrollsubstrat

Kontrollsubstratet består av bassubstrat, testämne och avjoniserat vatten. Om en tillsättningsämne används ska ett extra kontrollsubstrat innehålla samma mängd tillsättningsämne.

1.6.1.2 Testbehållare

Glasbehållare med ett omfång av ca 1 liter (korrekt täckta med plastlock, plattor eller plastfolie med ventilationshål) fyllda med en mängd våt test- eller kontrollsubstrat motsvarande 500 g av substratets torrvikt.

1.6.2 *Testbetingelser*

Behållarna förvaras i klimatkammare vid en temperatur av 20 °C med en tolerans av ± 2 °C och i konstant ljus. Ljusintensiteten bör vara 400–800 lux.

Testperioden varar i 14 dagar, men dödligheten kan eventuellt bedömas sju dagar efter testets inledning.

1.6.3 *Förfarande*

Testkoncentrationer

Testämnets koncentrationer uttrycks som ämnets vikt i förhållande till grundsubstratets torrsvikt (mg/kg).

Förtest

Det koncentrationsområde som orsakar 0–100 % dödlighet kan bestämmas genom ett förtest för att få information om vidden av koncentrationer som ska användas vid det definitiva testet.

▼B

Ämnet bör testas i följande koncentrationer: 1 000, 100, 10, 1 och 0,1 mg/ämne/kg testsubstrat (torrvikt).

Om en fullständig definitiv test ska göras räcker det att för förtestet använda en uppsättning per koncentration och en för den obehandlade kontrollen med vardera tio daggmaskar.

Definitivt test

Resultaten av förtestet används för att välja minst fem koncentrationer i en geometrisk serie som täcker 0–100 % dödlighet och där den konstanta faktorn inte får överstiga 1,8.

Vid test med dessa koncentrationer bör det vara möjligt att med största möjhga exakthet bedöma LC_{50}-värdet och dess konfidensgränser.

Vid det definitiva testet används minst fyra testgrupper per koncentration och fyra obehandlade kontrollgrupper med vardera tio daggmaskar. Resultaten av dessa parallellgrupper anges som ett medelvärde och en standardavvikelse.

Om två på varandra följande koncentrationer, med ett förhållande av 1,8, endast ger 0 och 100 % dödlighet är dessa två värden tillräckliga för att ange LC_{50}-interval! et.

Blandning av bassubstratet och testämnet

Testämnet bereds, när så är möjligt, utan tillsättning av annat än vatten. Omdelbart före inledningen av testet blandas en emulsion eller dispersion av tesämnet i avjoniserat vatten eller annat lösningsmedel med bassubstratet eller sprayas ut jämnt över detta med en fin kromatografispruta eller liknande.

Om testämnet inte går att lösa i vatten kan det lösas i minsta möjliga mängd av ett passande organiskt lösningsmedel (t.ex. hexan, aceton eller kloroform).

Endast medel som inte går att lösa i vatten för användas för att upplösa, dispergera eller emulgera testämnet. Testsubstratet luftas innan användning. Den förångade vattenmängden ersätts. Kontrollsubstratet får innehålla eventuella tillsättningsämnen i samma mängd.

Om det inte går att lösa, dispergera eller emulgera testämnet i organiska lösningsmedel blandas en blandning av finsand av malen kvarts och den kvantitet av testämnet som är nödvändig för att behandla 500 g torrvikt av syntetisk jord med 490 g torrvikt av testämnet.

För varje testgrupp placeras en mängd våt testsubstrat motsvarande 500 g torrvikt i varje glasbehållare och tio daggmaskar, som under 24 timmar har invänjts i ett liknande vått bassubstrat och därefter snabbt sköljts av och avdroppats på filterpapper innan användning, placeras på testsubstratets yta.

▼B

Behållarna täcks med perforerade plastlock, plattor eller plastfolie för att förhindra att substratet torkar, och de förvaras under testbetingelse i 14 dagar.

Utvärderingen sker 14 dagar (alternativt sju dagar) efter testets inledning. Substratet sprids ut på en platta av glas eller rostfritt stål. Daggmaskarna undersöks och antalet överlevande daggmaskar fastställs. Daggmaskar anses vara döda om de inte reagerar på en lätt mekanisk påverkan av framänden.

När undersökningen sker efter sju dagar hälls substratet tillbaka i behållaren och överlevande daggmaskar läggs tillbaka pä testsubstratets yta.

1.6.4 *Testorganismer*

Testorganismerna bör vara daggmaskar av arten *Eisenia foetida* (se anmärkningen i tillägget) (minst två månader gamla med clitellum) och väga (vått tillstånd) 300–600 mg. (För uppfödning se tillägget).

2. **DATA**

2.1 BEHANDLING OCH UTVÄRDERING AV DATA

De använda koncentrationerna av testämnet rapporteras med angivelse av den procentuella dödligheten för varje koncentration.

När erhållna data inte är tillräckliga kan LC_{50} och dess konfidensgränser (p = 0,05) bestämmas genom användning av standardmetoder (Lichtfield and Wilcoxon, 1949, eller motsvarande metod). LC_{50} anges som mg testämne per kg testsubstrat (torrvikt)

Om koncentrationskurvans böjning vid ett förhållande av 1,8 endast ger 0 och 100 % dödlighet är dessa två värden tillräckliga för att ange LC_{50}-intervallet.

3. RAPPORTERING

3.1 TESTRAPPORT

Testrapporten ska om möjligt innehålla:

— Angivelse av att testet utförts i överensstämmelse med ovanstående kvalitetskriterier.

— Angivelse av det genomförda testet (förtest och/eller definitivt test).

— Noggrann beskrivning av testbetingelserna eller angivelse av att testet utförts i överensstämmelse med metoden. Eventuella avvikelser ska rapporteras.

— Noggrann beskrivning av hur testämnet blandats i bassubstratet.

— Uppgifter om testorganismer (art, ålder, medelvikt samt lägsta och högsta vikt, betingelserna för uppfödning och hållning samt leverantör).

▼B

— Använd metod för bestämning av LC_{50}.

— Testresultaten, inbegripet alla använda data.

— Beskrivning av observerade symptom eller beteendeförändringar hos testorganismerna.

— Dödlighet i kontrollgrupperna.

— LC_{50} eller högsta testkoncentration utan dödlighet och lägsta testkoncentration med en dödlig het av 100 % 14 dagar (alternativt sju dagar) efter testets inledning.

— Ritning av koncentrations/reaktionskurvan.

— Resultat som erhållits med referensämnet antingen i samband med det ifrågavarande testet eller vid tidigare kvalitetskontrollundersökningar.

4. **HÄNVISNINGAR**

1. OECD (1981), *Test Guideline 207,* rådets beslut K(81) 30 slutlig.

2. Edwards, C. A. och Lofty, (1977), *Biology of Earthworms.* London: Chapman and Hall, s. 331.

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

4. Litchfield, J. T. och Wilcoxon J.(1949), A simplified method of evaluating dose-effect experi ments, J. *Pharm. Esp. Therap.,* vol. 96, s. 99–113.

5. Europeiska gemenskapernas kommission, *Development of a standard laboratory method for assaying the toxicity of chemical substances to earthworms,* Rapport EUR 8714 EN.

6. Umweltsbundesamt/Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Berlin (1984), Verfahrensvorschlag Toxizitätstest am Regenwurm Eisenia foetida in künstlichem Boden, i: Rudolph/Boje: *Ökotoxikologie,* ecomed, Landsberg, 1986.

▼B

Tillägg

Uppfödning och hållning av daggmaskar före test

Vid uppfödning av djuren placeras 30–50 vuxna daggmaskar i en avelsbur med färsk substrat och avlägsnas efter 14 dagar. Dessa djur kan användas för uppfödning av senare grupper. De daggmaskar som kläcks ur kokongerna används för test när de är könsmogna (under föreskrivna villkor efter 2–3 månader).

Förhållanden för hållning och uppfödning

Klimatkammare:	Temperatur 20 °C med en tolerans av ± 2 °C, helst med konstant belysning (ljusintensitet 400–800 lux).
Avelsburar:	Lämpliga låga burar med en volym av 10–20 l.
Substrat:	*Eisennia foetida* kan födas upp i olika djurexkrement. Som uppfödningsmedium rekommenderas en blandning av lika delar av torv och ko- eller hästgödsel. Substratet bör ha ett pH-värde av 6–7 (reglerat med kalciumkarbonat) och låg jonledningsförmåga (under 6 mmhos eller 0,5 % saltkoncentration). Substratet bör vara fuktigt men inte för vått. Andra lämpliga metoder utöver ovan nämnda kan användas.

Anmärkning: Det finns två raser av *Eisenia foetida* som vissa systematiker har klassificerat som arter (Bouche, 1972). De är morfologiskt liknande men den ena, *Eisenia foetida foetida* har typiskt tvärgående ränder på segmenten medan den andra, *Eisenia foetida andrei,* saknar dessa, och har en rödbrokig färg. Så långt det går bör *Eisenia foetida andrei* användas. Andra arter kan användas om den nödvändiga metodiken finns tillgänglig.

▼B

C.9 BIOLOGISK NEDBRYTBARHET

ZAHN-WELLENS TEST

1. METOD

1.1 INLEDNING

Syftet med denna metod är att mäta bionedbrytbarheten hos vattenlösliga, icke flyktiga organiska föreningar när de utsätts relativt höga koncentrationer av mikroorganismer under ett statiskt test.

Fysikaliska-kemiska reaktioner kan förekomma på de uppslammade artiklarna vilket man måste ta hänsyn till vid tolkning av resultaten (se 3.2).

De ämnen som ska undersökas används i koncentrationer motsvarande DOC-värden av 50–400 mg/l (DOC = dissolved organic carbon, dvs. upplöst organiskt kol), eller COD-värden motsvarande 100–1 000 mg/l (COD = chemical oxygen demand, dvs. kemiskt syrebehov). Fördelen med dessa relativt höga koncentrationer är att de är pålitliga ur analyshänseende.

Vid denna metod mäts koncentrationer av upplöst organiskt kol eller det kemiska syrebehovet i syfte att bedöma testämnets fullständiga bionedbrytbarhet.

Samtidig användning av en specifik analysmetod kan möjliggöra värdering av ämnets primära bionedbrytbarhet (dvs. försvinnandet av den ursprungliga kemiska förbindelsen).

Metoden kan endast tillämpas på organiska testämnen som vid den använda testkoncentrationen

— är vattenlösliga inom ramen för testbetingelserna,

— har försumbart ångtryck inom ramen för testbetingelserna,

— inte hämmar bakterier,

— endast absorberas i testsystemet i begränsad omfattning,

— inte försvinner från testlösningen till följd av skumning.

Uppgifter om de relativa proportionerna av testämnets huvudbeståndsdelar är till nytta vid tolkningen av de erhållna resultaten, särskilt om resultaten är låga eller marginella.

Uppgifter om testämnets toxicitet för mikroorganismer kan vara till nytta vid tolkningen av låga resultat och vid valet av lämpliga testkoncentrationer.

▼B

1.2 DEFINITIONER OCH ENHETER

Nedbrytningen vid testets avslutning definieras som ”bionedbrytbarhet i Zahn-Wellens test”:

$$D_T(\%) = \left[1 - \frac{(C_T - C_B)}{(C_A - C_{BA})}\right] \times 100$$

där:

D_T = Bionedbrytning i procent DOC som avgått vid tid T.

C_A = DOC (eller COD)-värdena i försöksblandningen, mätt tre timmar efter inledning av testet (mg/l) (DOC = dissolved organic carbon/upplöst organiskt kol, COD = chemical oxygen demand/kemiskt syrebehov).

C_T = DOC- eller COD-värdena i försöksblandningen vid tidpunkten för provtagningen (mg/l).

C_B = DOC- eller COD-värdena i blindprovet vid tidpunkten för provtagningen (mg/l).

C_{BA} = DOC- eller COD-värdena i blindprovet, mätt tre timmar efter inledning av testet (mg/l).

Nedbrytningsgraden avrundas till närmaste hela procenttal.

Den procentuella nedbrytningen anges som den procent DOC (eller COD) som försvunnit från testämnet.

Skillnaden mellan det värde som mätts efter tre timmmar och det beräknade, helst uppmätta, initiala värdet kan ge nyttiga information om ämnets eliminiering (se 3.2 ”Tolkning av resultat”).

1.3 REFERENSÄMNEN

När ett nytt ämne ska undersökas kan referensämnen i vissa fall vara användbara. Det går dock ännu inte att rekommendera bestämda referensämnen.

1.4 TESTMETODSPRINCIP

Aktiverat slam, oorganiska näringsämnen och testämnet, som är den enda kolämnekällan i vattenlösning, placeras i en glasbehållare med en volym av 1–4 liter, som är försedd med omrörning och luftning. Blandningen rörs och luftas vid 20–25 °C i indirekt ljus eller i mörker i upp till 28 dagar. Nedbrytningen följs genom mätning av DOC-(eller COD-)värden i den filtrerade lösningen en gång om dagen eller regelbundet med en annan lämplig tidsintervall. Förhållandet mellan eliminerat DOC (eller COD) efter varje tidsintervall och värden tre timmar efter testets inledning uttrycks som procentuell bionedbrytning och är ett värde för nedbrytningsgraden vid denna tidpunkt.

Om en specifik analysmetod används kan ändringar av det ursprungliga ämnets koncentration till följd av bionedbrytning mätas (primär bionedbrytning).

▼B

1.5 KVALITETSKRITERIER

Metodens reproducerbarhet har fastställts genom ett ringtest.

Metodens känslighet beror till största delen på variationer i blindprovet och till mindre del på noggrannheten vid bestämning av upplöst organiskt kol och testämnekoncentration i vätskan.

1.6 METODBESKRIVNING

1.6.1 *Förberedelser*

1.6.1.1 Reagenser

Testvatten: Dricksvatten innehållande mindre än 5 mg organiskt kol per liter. Koncentrationen av kalcium- och magnesiumjoner får tillsammans inte överstiga 2,7 mmol per liter. I motsatt fall måste den förtunnas på passande sätt med avjoniserat eller destillerat vatten.

Svavelsyra, analytisk reagens (AR.):	50 g/l.
Natriumhydroxidlösning, AR.:	40 g/l.
Lösning av oorganiska näringsämnen: i 1 liter avjoniserat vatten löses	
ammoniumklorid, NH_4C1, AR:	38,5 g.
natriumdihydrogenfosfat, NaH_2PO_4. $2H_2O$, AR:	33,4 g.
kaliumdihydrogenfosfat, KH_2PO_4, AR:	8,5 g.
dikaliumhydrogenfosfat, K_2HPO_4, AR:	21,75 g.

1.6.1.2 Apparatur

Glasbehållare med en volym av 1–4 liter (t.ex. cylindrisk behållare).

Omrörare med rörhuvud av glas eller metall på en passande axel (omröraren bör rotera 5–10 cm över behållarens botten). Som ett alternativ kan en magnetomrörare med en 7–10 cm lång mangnetstav användas.

Glasrör med en invändig diameter av 2–4 mm för luftning. Rörets öppning bör ligga ca 1 cm ovanför behållarens botten.

Centrifug (ca 3 550 g).

pH-mätare.

Apparat för mätning av upplöst syre.

Pappersfilter.

▼B

Membranfiltreringsapparat.

Membranfilter med en porstorlek av 0,45 μm. Membranfilter är endast lämpligt om det har säkerställts att de varken avger kolämne eller absorberar ämnet under filtreringen.

Analysapparatur för bestämning av innehållet av organiskt kol och den kemiska syrebehovet.

1.6.1.3 Förberedelse a v inokulat

Aktiverat slam från ett biologiskt reningsverk tvättas (flera gånger) med testvatten (se ovan) genom centrifugering eller dekantering.

Det aktiverade slammet ska vara i ett lämpligt tillstånd. Sådant slam kan fås från ett väl fungerande reningsverk som huvudsakligen behandlar spillvatten. För att få så många olika bakteriestammar som möjligt kan det vara bättre att blanda inokulat från olika källor (t.ex. från olika reningsverk, från jord, från flodvatten, etc.).

De aktiverade slammets livskraft kontrolleras, se. ”lämplighetskontroll”.

1.6.1.4 Framställning a v testlösningarna

1 testbehållarna placeras 500 ml vatten, 2,5 ml lösning av oorganiska näringsämnen per liter samt en mängd aktiverat slam som motsvarar 0,2–1,0 g torrämne per liter färdig blandning. Tillsätt tillräckligt med stamlösning av testämnet så att den färdiga blandningen får en DOC-koncentration av 50–400 mg/l. Motsvarande COD-intervall är 100–1 000 mg/l. Fyll upp med testvatten till en total volym av 1–4 liter. Den totala volym som väljs beror på det antal prover som ska tas för DOC-eller COD-bestämning, och den nödvändiga analysvolymen.

Normalt kan en volym av 2 l anses tillräcklig. Minst en kontrollbehållare (blindprov) ska göras i ordning samtidigt med varje testsene. Den innehåller endast aktiverat slam och lösning av oorganiska näringsämnen utspätt med vatten till samma totalvolym som i testbehållarna.

1.6.2 *Testförfarande*

Testbehållarna omrörs med magnetomrörare eller propelleromrörare i indirekt belysning eller i mörker vid 20–25 ^{o}C. Luftning sker med komprimerad luft som om nödvändigt rensas med ett vadd-filter och en tvättflaska. Man måste se till att slammet inte sätter sig och att syrekoncentrationen inte sjunker under 2 mg/l.

pH-värdet måste kontrolleras regelbundet (t.ex. dagligen) och vid behov justeras till pH 7–8.

▼B

Strax före provtagning kompenseras vattenförlust på grund av förångning genom tillsättning av avjoniserat eller destillerat vatten. Man kan t.ex. märka vätskehöjden i behållaren innan testet inleds. Nya markeringar ritas dit efter varje provtagning (utan luftning och omrörning). De första proverna tas alltid tre timmar efter testets inledning så att man kan konstatera om testmaterialet absorberas på det aktiverade slammet.

Elimineringen av testämnet följs genom DOC- eller COD-bestämningar antingen dagligen eller regelbundet med andra intervaller. Proverna från testbehållaren och blindprovet filtreras genom ett noggrant tvättat pappersfilter. De första 5 ml av filtratet kasseras. Slam som är svårt att filtrera kan avlägsnas först genom centrifugering i tio minuter. Minst dubbla bestämningar av DOC och COD ska göras. Testet varar i upp till 28 dagar.

Obs! Prover som stadigt är grumliga filtreras genom ett membranfilter. Membranfiltren får varken frigöra eller absorbera organiska material.

Funktionskontroll a v aktiverat slam

I varje testserie bör det ingå en behållare som innehåller ett känt ämne så att man kan kontrollera funktionen av det aktiverade slammet. 1 detta syfte är dietynglykol lämpligt.

Adaption

Om analyser utförs med relativt korta mellanrum (t.ex. dagligen) kommer adaption att framgå tydligt av nedbrytningskurvan (se figur 2). Testet bör därför inte inledas omedelbart före helgen.

Om adaption förekommer i slutet av testet kan testet förlängas tills nedbrytningen är avslutad.

Obs! Om det finns behov av att veta mer om det adapterade slammets beteende utsätts samma aktiverade slam ytterligare en gång för samma testmaterial enligt följande förfarande:

Stäng av omröraren och luftaren och låt det aktiverade slammet sätta sig. Avlägsna överstående vätska, fyll på upp till 2 liter med testvatten och rör om i 15 minuter och låt sedan blandningen sätta sig igen. Sedan överstående vätska avlägsnats används det överblivande slammet för att upprepa testet i enlighet med 1.6.1.4 och 1.6.2 ovan. Det aktiverade slammet kan även isoleras genom centrifugering istället för utfällning.

Det adapterade slammet kan blandas med färskt slam till en koncentration av 0,2–1,0 g torrvikt/l.

▼B

Analys

Normalt filtreras prover genom ett noggrant tvättat pappersfilter (för tvättning används avjoniserat vatten).

Prover som stadigt är oklara filtreras genom ett membranfilter (0,45 μm).

En dubbelbestämning av DOC-koncentrationen i provfiltraten görs (de första 5 ml kasseras) med TOC-instrument. Om filtratet inte kan analyseras samma dag ska det förvaras i kylskåp till nästa dag. Längre tids förvaring rekommenderas inte.

COD-koncentrationen bestäms i provfiltraten med COD-koncentrationsutrustning i enlighet med det förfarande som beskrivs i hänvisning 2 nedan.

2. **DATA OCH UTVÄRDERING**

Minst dubbelbestämning av DOC- och COD-koncentrationerna i proverna görs i enlighet med 1.6.2. Nedbrytbarheten vid tidpunkten T beräknas med hjälp av den formel (med definitioner) som anges i 1.2.

Nedbrytningsgraden beräknas till närmaste hela procenttal. De nedbrytning som erhålls vid slutet av testet anges som ”bionedbrytbarheten vid Zahn-Wellens test”.

Obs! Om fullständig nedbrytning inte uppnås innan testperioden är slut och detta resultat bekräftas genom en ytterligare analys följande dag kan testet avslutas.

3. **RAPPORTERING**

3.1 TESTRAPPORT

Testrapporten ska om möjligt innehålla minst följande:

— Testämnets initiala koncentration.

— Alla andra upplysningar och försöksresultat i fråga om testämnet, en eventuell referensämne och blindförsöket.

— Koncentrationen efter tre timmar.

— Kurva över bionedbrytningen med förklaring.

— När och var provorganismerna är tagna, adaptionsgrad, använd koncentration, etc.

— Vetenskapliga motiveringar för eventuella ändringar av testförfarandet.

3.2 TOLKNING AV RESULTAT

Den förlust av DOC (COD) som sker gradvis över dagar eller veckor är ett tecken på bionedbrytbarhet hos testämnet.

▼B

Fysikalisk-kemisk absorption kan dock i vissa fall spela en viss roll och ett tecken på detta är att före de första tre timmarna sker fullständig eller delvis förlust och att skillnaden mellan överstående vätska från kontroll- och testproverna förblir på en oväntat läg nivå.

Det är nödvändigt att göra ytterligare tester om man ska kunna skilja på bionedbrytning (eller delvis bionedbrytning) och absorption.

Detta kan göras på flera olika sätt, men det mest övertygande är att använda överstående vätska som inokulum i en bassettest (helst ett respirometriskt test).

Testämnen som visar en hög förlust av DOC (COD), som inte beror på absorption, vid denna test bör betraktas som potentiellt bionedbrytbara. Delvis förlust som inte beror på absorption, betyder att kemikalien i varje fall i en viss omfattning bryts ned biologiskt.

Låg eller ingen förlust av DOC (COD) kan bero på att testämnet hämmar mikroorganismerna. Detta kan med tiden också visa sig genom att slammet upplöses och försvinner, varvid överstående vätska blir grumlig. Testet bör upprepas med en lägre koncentration testämne. Användning av ett ämnesspecifik analysmetod eller ^{14}C-markerat testämne kan ge större känslighet. Om ^{14}C-markerat testämne används kommer återhämtning av $^{14}CO_2$ bekräfta att det ror sig om bionedbrytbarhet.

Om resultaten anges som primär bionedbrytbarhet bör det om möjligt anges en förklaring på den kemiska strukturförändringen som leder till avsaknaden av analysresultat för det ursprungliga testämnet.

Valet av analysmetoder ska motiveras och analysresultaten för blindproven ska anges.

4. **HÄNVISNINGAR**

1. OECD, Paris (1981), *Test Guideline* 302 B, rådets beslut K(81) 30 slutlig.

2. Bilaga V C.9 Nedbrytning – kemiskt syrebehov, kommissionens direktiv 84/449/EEG, *Europeiska gemenskapernas officiella tidning* L 251, 19.9.1984.

▼B

Tillägg

EXEMPEL PÅ UTVÄRDERING

Organisk förbindelse:	4-etoxybenzoesyra
Teoretis testkoncentration:	600 mg/l
Teoretisk DOC:	390 mg/l
Inoculat:	Reningsverk
Koncentration:	1 g torrämne per liter
Enventuell adaption:	inte adapterat
Analys:	DOC-bestämning
Testmängd:	3 ml
Kontrollämne:	Dietylenglykol
Ämnets toxicitet:	Ingen toxicitet under 1 000 Använt test: fermenteringsglastestmg/l

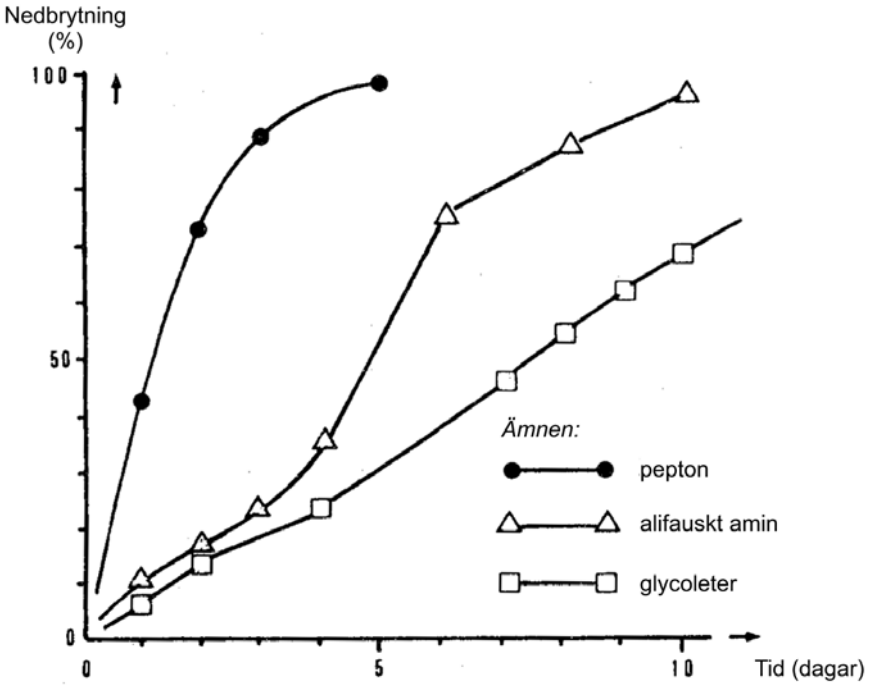
Tidpunkt	Kontrollämne				Testämne		
	Blindprov DOC ([1]) (mg/l)	DOC ([1]) (mg/l)	DOC netto (mg/l)	Nedbrytning (%)	DOC ([1]) (mg/l)	DOC netto (mg/l)	Nedbrytning (%)
0	—	—	300,0	—	—	390,0	—
3 timmar	4,0	298,0	294,0	2	371,6	367,6	6
1 dag	6,1	288,3	282,2	6	373,3	367,2	6
2 dagar	5,0	281,2	276,2	8	360,0	355,0	9
5 dagar	6,3	270,5	264,2	12	193,8	187,5	52
6 dagar	7,4	253,3	245,9	18	143,9	136,5	65
7 dagar	11,3	212,5	201,2	33	104,5	93,2	76
8 dagar	7,8	142,5	134,7	55	58,9	51,1	87
9 dagar	7,0	35,0	28,0	91	18,1	11,1	97
10 dagar	18,0	37,0	19,0	94	20,0	2,0	99

([1]) Medelvärde av tre bestämningar.

▼B

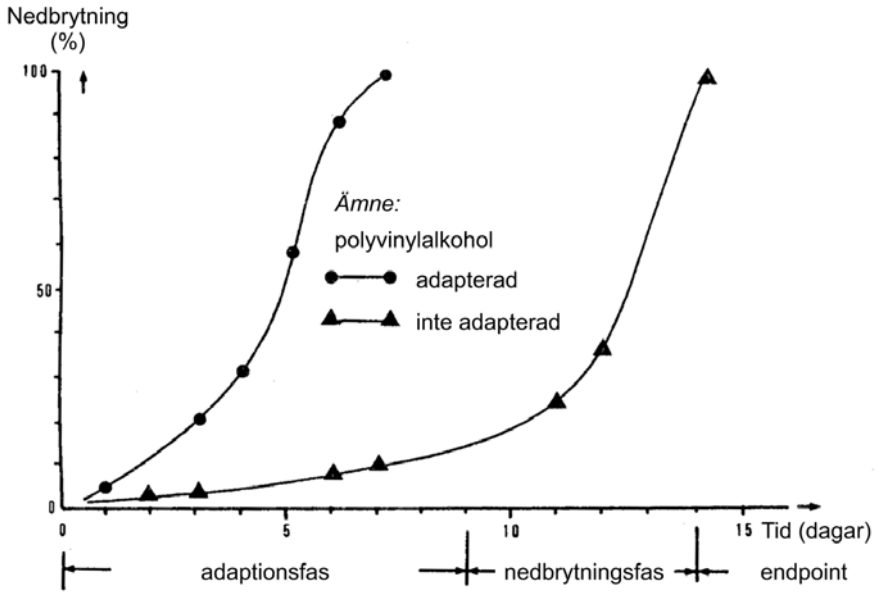
Figur 1

Exempel på kurvor över bionedbrytning



Figur 2

Exempel på slamadaption



▼M4

C.10 **SIMULATIONSTEST AEROB AVLOPPSVATTENBEHANDLING C.10-A: ENHETERNA FÖR AKTIVERAT SLAM – C.10-B BIOFILMER**

C.10-A: **Enheterna för aktiverat slam**

INLEDNING

1. Denna testmetod motsvarar OECD:s testriktlinje 303 (2001). På 1950-talet insåg man att de ytaktiva ämnen som nyligen tagits i bruk orsakade kraftig skumbildning i avloppsreningsverk och i vattendrag. De avlägsnades inte helt under den aeroba behandlingen och i vissa fall kunde annat organiskt material inte avlägsnas. Detta föranledde många undersökningar om hur ytaktiva ämnen kunde avlägsnas från avloppsvatten och huruvida nya kemikalier producerade av industrin svarade på avloppsvattenrening. För detta användes modeller som representerar de två huvudtyperna av aerob biologisk avloppsvattenrening (aktiverat slam och perkolations- eller bakteriefilter). Det hade varit mycket opraktiskt och dyrt att distribuera varje ny kemikalie och övervaka storskaliga reningsverk, även på lokal basis.

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN

Enheterna för aktiverat slam

2. I beskrivningarna har modellerna för enheterna för aktiverat slam varierat i storlek mellan 300 ml och cirka 2 000 ml. Vissa av modellerna hade stora likheter med storskaliga anläggningar, med slamsedimenteringstankar där det sedimenterade slammet pumpas tillbaka till luftningstanken, medan andra inte hade sedimenteringsutrustning, t.ex. Swisher (1). Apparaturens storlek är en kompromiss – å ena sidan måste den vara tillräckligt stor för att de mekaniska operationerna ska fungera väl och för att tillåta tillräcklig provtagningsvolym utan att påverka själva operationen och å andra sidan får den inte vara så stor att utrymmes- och materialbehoven blir för stora.

3. Två typer av utrustning som har använts i omfattande utsträckning och med tillfredsställande resultat är Husmann-enheter (2) och Porous Pot-enheter (3) (4), som först användes för studier av ytaktiva ämnen; dessa beskrivs i denna testmetod. Även andra enheter har använts med framgång, t.ex. Eckenfelder (5). Detta simuleringstest är relativt dyrt och resurskrävande, och därför gjordes en parallell undersökning av enklare och förmånligare screeningtest (se kapitel C.4 A–F i denna bilaga) (6). Erfarenheterna med olika ytaktiva ämnen och andra kemikalier har visat att de som klarade screeningtest (lätt nedbrytbara) också bröts ned vid simuleringstestningen. Vissa av dem som inte klarade screeningtest klarade test för lättnedbrytbarhet (kapitlen C.12.7 och C.19.8 i denna bilaga), men endast en del i denna senare grupp bröts ned vid simuleringstest, medan de kemikalier som inte klarade test för lättnedbrytbarhet inte bröts ned i simuleringstest (9) (10) 11).

4. För vissa ändamål kan simuleringstest som gjorts vid en enda uppsättning betingelser vara tillräckliga, och då uttrycks resultaten som en procentandel avlägsnad kemikalie eller upplöst organiskt kol (DOC). En beskrivning av ett sådant test ges i denna testmetod. Till skillnad från den tidigare versionen av detta kapitel, där endast en enda typ av apparatur för behandling av

▼M4

syntetiskt avloppsvatten i kopplad utformning med användning av en relativt primitiv metod för kassering av slam beskrevs, erbjuder denna beskrivning ett antal variationer. Den innehåller beskrivningar av alternativa typer av apparatur, arbetssätt, avloppsvatten och avlägsnande av kasserat slam. Denna text följer nära texten till ISO 11733 (12), som granskades i detalj vid utarbetningen, även om metoden inte har varit föremål för ringtest.

5. För andra ändamål krävs en mer exakt kännedom om testkemikaliens koncentration i utflödet, vilket i sin tur kräver en mer omfattande metod. Som exempel kan nämnas att kasseringen av slam måste kontrolleras exaktare under varje dag och under hela testperioden, och enheterna måste köras med ett antal olika andelar kasserat slam. För en heltäckande metod bör tester även köras vid två eller tre olika temperaturer; en sådan metod beskrivs av Birch (13) (14) och sammanfattas i tillägg 6. De nuvarande kunskaperna är dock inte tillräckliga för att slå fast vilken av de kinetiska modellerna som kan tillämpas på biologisk nedbrytbarhet för kemikalier vid avloppsrening och allmänt taget i vattenmiljö. Tillämpningen av Monod-kinetik (exempel ges i tillägg 6) begränsas till kemikaliehalter på minst 1 mg/l, men det finns de som anser att även detta återstår att bevisa. I tillägg 7 anges tester vid koncentrationer som mer sanningsenligt återspeglar koncentrationerna i avloppsvatten, men sådana tester och tester enligt tillägg 6 finns angivna i tilläggen, och inte som separata testmetoder.

Filter

6. Modelleringen av perkolationsfilter har ägnats mycket mindre uppmärksamhet, kanske för att de är besvärliga och mindre kompakta än modellerna för aktivslamanläggningar. Gerike m.fl. utvecklade enheter med bakteriefilter (trickling filter) och använde enheterna i kopplat utförande (15). Dessa filter var relativt stora (höjd 2 m, volym 60 l) och varje filter krävde så mycket som 2 liter avloppsvatten i timmen. Baumann m.fl. (16) simulerade bakteriefilter genom att fylla 1 m långa rör (14 mm innerdiameter) med remsor av polyesterfleece som först hade hållits i koncentrerat aktiverat slam i 30 minuter. Testkemikalien i form av ensam kolkälla i en mineralsaltlösning matades ned i det vertikala röret och den biologiska nedbrytbarheten bedömdes enligt mätningar av DOC i utflödet och CO_2 i utkommande gas.

7. Biofilter har även simulerats på annat sätt (15) – innerytorna i roterande rör som har en lätt horisontell lutning matas med avloppsvatten (cirka 250 ml/timme) med och utan testkemikalie, och de uppsamlade utflödena analyseras för DOC och/eller den berörda testkemikalien.

PRINCIP FÖR TESTMETODEN

8. Denna metod är avsedd för att bestämma eliminering samt primär och/eller slutlig biologisk nedbrytning av vattenlösliga organiska kemikalier som görs av aeroba mikroorganismer i ett kontinuerligt fungerande testsystem som simulerar aktivslamprocessen. Ett lättnedbrytbart organiskt medium och den organiska testkemikalien fungerar som kolkälla och energikälla för mikroorganismerna.

9. Två kontinuerligt arbetande testenheter (aktivslamanläggningar eller Porous Pot-enheter körs parallellt under identiska betingelser som väljs enligt teständamålet. Normalt är den hydrauliska medelretentionstiden 6 timmar och slammets medelålder (slamretentionstid) 6–10 dagar. Slam kasseras genom en av två metoder, testkemikalien tillsätts i regel i en koncentration mellan 10 mg/l upplöst organiskt kol (DOC) och 20 mg/l DOC till inflödet (organiskt medium) endast till en av enheterna. Den andra enheten används som kontrollenhet för att bestämma den biologiska nedbrytbarheten för det organiska mediet.

▼M4

10. Frekvent tagna prover av utflödet analyseras för DOC (helst) eller kemisk syreförbrukning (COD), samt koncentrationen av testkemikalie (om så krävs genom specifik analys) i utflödet från enheten som matas med testkemikalie. Skillnaden mellan utflödeskoncentrationerna DOC eller COD i test- och kontrollenheterna antas bero på testkemikalien eller dess organiska metaboliter. Denna skillnad jämförs med inflödets koncentration DOC eller COD på grund av testkemikalien, för att bestämma elimineringen av testkemikalien.

11. Den biologiska nedbrytbarheten kan i regel särskiljas från biologisk adsorption genom detaljerad analys av eliminering/tid-kurvan och kan ofta bekräftas genom test för biologisk lättnedbrytbarhet med användning av acklimatiserat inokulat från enheten som matas med testkemikalie.

INFORMATION OM TESTKEMIKALIEN

12. Testkemikaliens renhet, vattenlöslighet, flyktighet och adsorptionsegenskaper bör vara kända, för att resultaten ska kunna tolkas korrekt. I regel kan flyktiga och olösliga kemikalier inte testas, om inte särskilda åtgärder vidtas (se tillägg 5). Likaså bör den kemiska strukturen eller minst den empiriska formeln vara känd, med tanke på kalkylering av teoretiska värden och/eller kontroll av uppmätta parametervärden, t.ex. teoretisk syreförbrukning (ThOD), upplöst organiskt kol (DOC) och kemisk syreförbrukning (COD).

13. Information om testkemikaliens toxicitet för mikroorganismer (se tillägg 4) kan vara till nytta vid val av lämpliga testkoncentrationer och kan vara väsentlig för en korrekt tolkning av låga värden för biologisk nedbrytbarhet.

GODKÄNNANDENIVÅER

14. Enligt den ursprungliga tillämpningen av detta simuleringstest (bekräftande test) på primär biologisk nedbrytning av ytaktiva ämnen krävs mer än 80 % eliminering av den berörda kemikalien för att det ytaktiva ämnet ska få släppas ut på marknaden. Om 80 % eliminering inte uppnås, kan detta simuleringstest (bekräftande test) tillämpas, och det ytaktiva ämnet får endast släppas ut på marknaden förutsatt att mer än 90 % av kemikalien elimineras. Generellt gäller för kemikalier inte frågan om godkänt/ej godkänt, och värdet på den procentuella eliminering som erhållits kan användas i uppskattningsberäkningar av den sannolika miljökoncentration som kan användas vid farobedömning för kemikalier. Resultaten tenderar att följa ett ”allt eller inget”-mönster. I ett antal studier av rena kemikalier konstaterades att elimineringsprocenten för DOC var > 90 % i mer än tre fjärdedelar av fallen och > 80 % i över 90 % av fallen för kemikalier som över huvud taget visade betydande grad av biologisk nedbrytbarhet.

15. Relativt få kemikalier (t.ex. ytaktiva ämnen) förekommer i avloppsvatten i de koncentrationer (cirka 10 mg C/l) som används i detta test. Vissa kemikalier kan vara hämmande vid dessa koncentrationer, medan elimineringskinetiken för andra kemikalier kan vara annorlunda vid låga koncentrationer. En exaktare bedömning av nedbrytningen kan göras med användning av modifierade metoder med realistiskt låga koncentrationer av testkemikalien, och erhållna data kan användas för att beräkna kinetiska konstanter. De nödvändiga försöksteknikerna har dock ännu inte utvärderats till fullo och de kinetiska modeller som beskriver reaktionerna vid biologisk nedbrytning har inte heller fastställts (se tillägg 7).

▼M4

REFERENSKEMIKALIER

16. För att säkerställa att försöksförfarandet genomförs korrekt är det lämpligt att med vissa mellanrum testa kemikalier med känt beteende samtidigt som testkemikalier undersöks. Sådana kemikalier är adipinsyra, 2-fenylfenol, 1-naftol, 2,2'-bifenyldikarboxylsyra, 1-naftoesyra osv. (9) (10) (11).

TESTRESULTATENS REPRODUCERBARHET

17. Det finns betydligt färre rapporter från studier rörande simuleringstest än från test rörande lätt bionedbrytbarhet. Reproducerbarheten mellan (simultana) replikat är god (inom 10–15 %) för testkemikalier som bryts ner till minst 80 %, men för kemikalier som är mindre nedbrytbara är variationen större. Mycket varierande resultat (t.ex. 10 %, 90 %) har även noterats för vissa gränskemikalier vid olika tillfällen inom de nio veckor som gäller för testningen.

18. Endast små skillnader har konstaterats i resultat som erhållits med de två typerna av apparatur, men vissa kemikalier har brutits ned i större omfattning och mer genomgående vid användning av avloppsvatten från hushåll än vid användning av syntetiskt avloppsvatten enligt OECD.

METODBESKRIVNING

Apparatur

Testsystem

19. Testsystemet för en testkemikalie består av en testenhet och en kontrollenhet, men när endast specifika analyser görs (primär biologisk nedbrytbarhet) behövs endast en testenhet. En och samma kontrollenhet kan användas för flera testenheter som matas med samma eller olika testkemikalier. Om koppling används (tillägg 3) måste varje testenhet ha en separat kontrollenhet. Testsystemet kan vara en modell av aktivslamanläggning, Husmann-enhet (tillägg 1, figur 1) eller Porous Pot (tillägg 1, figur 2). I båda fallen behövs tillräckligt stora förvaringskärl för inflöde och utflöde, såväl som pumpar för att dosera inflödet, antingen blandat med testkemikalie eller separat.

20. Varje aktivslamanläggning består av ett luftningskärl med en känd kapacitet på cirka 3 liter aktiverat slam och en separator (sekundärsedimentering) som rymmer cirka 1,5 liter. Volymerna kan i viss utsträckning få variera om separatorns höjd justeras. Kärl av olika storlek tillåts om de används med jämförbara hydrauliska belastningar. Om det inte är möjligt att hålla temperaturen i testningsrummet inom rätt intervall rekommenderas användning av mantlade kärl med temperaturkontrollerat vatten. En mammutpump (airlift pump) eller doseringspump används för att återföra aktivslammet från separatorn till luftningskärlet, antingen kontinuerligt eller intermittent.

21. Porous Pot-systemet består av en inre porös cylinder med konisk botten innanför ett lite större kärl med samma form men gjort av ett ogenomträngligt plastmaterial. Lämpligt material för innerkärlet är poröst polyetylen med maximal porstorlek på 90 µm och 2 mm tjocklek. Slammet separeras från det behandlade organiska mediet genom differentierad passage genom den porösa väggen. Utflödet går till det omgivande utrymmet från vilket det flödar över till uppsamlingskärlet. Ingen sedimentering sker och därför

▼M4

ingen återföring av slam. Hela systemet kan monteras in i ett termostatkontrollerat vattenbad. Porous Pots kan till en början blockeras och flöda över. Ersätt då den porösa fodringen med en ren fodring genom att först sifonera slammet från innerkärlet till ett rent kärl och ta ut den blockerade fodringen. När den ogenomträngliga yttre cylindern har rengjorts kan ett rent innerkärl sättas in och slammet tillsättas på nytt. Det slam som finns längs den blockerade fodringens väggar ska också skrapas loss omsorgsfullt och överföras. Rengör blockerade innerkärl genom att först avlägsna slamrester med en fin vattenstråle och därefter blötlägga i utspädd lösning av natriumhypoklorit, sedan i vatten, och därefter omsorgsfullt skölja med vatten.

22. För luftning av slammet i luftningskärlen i båda systemen krävs lämpliga system, t.ex. sintrade kuber (diffusorstenar) och tryckluft. Vid behov ska luften rengöras genom passage genom lämpligt filter och tvätt. Systemet måste ha genomflöde av tillräckligt med luft för att aeroba betingelser ska bibehållas och slamflockarna hållas suspenderade under hela testningen.

Filtreringsapparatur eller centrifug

23. Utrustning för filtrering av prover med membranfilter av lämplig porstorlek (nominell öppningsdiameter 0,45 μm) som adsorberar lösliga organiska kemikalier och har minimalt utsläpp av organiskt kol. Om de filter som används avger organiskt kol ska de tvättas försiktigt med hett vatten för att avlägsna detta kol. Alternativt kan man använda en centrifug som når upp till 40 000 m/s^2.

Analysutrustning

24. Apparatur som krävs för att bestämma

— DOC (upplöst organiskt kol) eller COD (kemisk syreförbrukning),

— specifik kemikalie, om så krävs,

— suspenderade fasta ämnen, pH, syrehalten i vatten,

— temperatur, surhet och alkalinitet,

— ammonium, nitrit och nitrat, om testet genomförs under nitrifikationsförhållanden.

Vatten

25. Kranvatten med mindre än 3 mg/l DOC. Bestäm alkaliniteten, om den inte redan är känd.

26. Avjoniserat vatten med mindre än 2 mg/l DOC.

Organiskt medium

27. Syntetiskt avloppsvatten, avloppsvatten från hushåll eller en blandning av båda kan användas som organiskt medium. Det har visat sig (11) (14) att användning av enbart avloppsvatten från hushåll ofta ger ökad procentandel DOC-eliminering och t.o.m. möjliggör eliminering och biologisk nedbrytning av vissa kemikalier som inte bryts ned när syntetiskt avloppsvatten enligt OECD används. Det betyder att kontinuerlig eller intermittent tillsättning av avloppsvatten från hushåll ofta stabiliserar det aktiva slammet och även förbättrar sedimenteringsegenskaperna, som är en central faktor. Därför rekommenderas användning av avloppsvatten från hushåll. Mät DOC- eller COD-koncentrationen i varje ny sats av organiskt medium. Det organiska mediets surhet eller alkalinitet ska vara känd. Om det organiska mediet har låg surhet eller alkalinitet kan det krävas tillsats av lämplig buffert (natriumvätekarbonat eller kaliumdivätefosfat) för att pH i luftningskärlet ska hållas kring 7,5 ± 0,5 under testet. Mängden buffert och tillsättningstidpunkten måste fastställas separat i varje enskilt fall. Om blandningar används antingen kontinuerligt eller intermittent, måste blandningens DOC (eller COD) hållas på ungefär konstant nivå t.ex. genom utspädning med vatten.

▼M4

Syntetiskt slam

28. Per liter kranvatten upplöses följande: 160 mg pepton, 110 mg köttextrakt, 30 mg urea, 28 mg vattenfritt dikaliumvätefosfat (K_2HPO_4), 7 mg natriumklorid (NaCl), 4 mg kalciumkloriddihydrat ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$) och 2 mg magnesiumsulfatheptahydrat ($Mg_2SO_4 \cdot 7H_2O$). Detta syntetiska avloppsvatten enligt OECD är ett exempel, och ger en medelkoncentration på cirka 100 mg/l DOC i inflödet. Alternativt kan man använda andra sammansättningar med ungefär samma DOC-koncentration, som ligger närmare verkligt avloppsvatten. Om ett mindre koncentrerat inflöde krävs kan det syntetiska avloppsvattnet spädas ut med kranvatten (t.ex. 1:1) för att få en koncentration på cirka 50 mg/l. En sådan lägre koncentration i inflödet ger bättre tillväxt av nitrifierande organismer, och denna modifiering bör användas om undersökningen gäller simulering av nitrifierande reningsverk. Detta syntetiska avloppsvatten kan göras i destillerat vatten i en koncentrerad form och förvaras i 1 °C upp till en vecka. Späd vid behov ut med kranvatten. (Detta medium är dock inte tillfredsställande, kvävekoncentrationen är t.ex. mycket hög och kolhalten relativt låg, men det finns inga bättre förslag utom tillsättning av mera fosfat som buffert samt extra pepton).

Avloppsvatten från hushåll

29. Använd färsk bottensats av avloppsvatten som samlas upp dagligen från reningsanläggningar som i huvudsak tar emot avloppsvatten från hushåll. Avloppsvattnet ska samlas upp före primär sedimentering, från primärsedimenteringstankens överflödeskanal eller från matningen till aktivslamanläggningen, och det ska till övervägande del vara fritt från grova partiklar. Avloppsvattnet kan lagras några dagar före användningen (i regel dock inte längre än sju dagar) vid cirka 4 °C, om det går att påvisa att DOC (eller COD) inte har sjunkit betydligt (mindre än 20 %) under lagringen. För att undvika systemstörningar ska DOC (eller COD) i varje ny sats justeras före användningen till ett lämpligt konstant värde, t.ex. genom utspädning med kranvatten.

Aktiverat slam

30. Samla in aktiverat slam för inokulering från luftningstanken vid ett välskött reningsverk eller från en aktivslamenhet i laboratorieskala som i huvudsak tar emot avloppsvatten från hushåll.

Stamlösningar av testkemikalien

31. För kemikalier med rimlig löslighet bereds stamlösningar vid lämpliga koncentrationer (t.ex. 1–5 g/l) i avjoniserat vatten eller i mineraldelen av syntetiskt avloppsvatten (för olösliga och flyktiga kemikalier, se tillägg 5). Bestäm DOC och totalt organiskt kol (TOC) för stamlösningen och upprepa mätningarna för varje ny sats. Om skillnaden mellan DOC och TOC är större än 20 % bör testkemikaliens vattenlöslighet kontrolleras. Jämför testkemikaliens DOC eller koncentration uppmätt genom specifik analys av stamlösningen med det nominella värdet, för att kunna bedöma om utbytet är tillräckligt bra (i regel kan > 90 % förväntas). Särskilt för dispersioner bör man försäkra sig om att DOC kan användas som analytisk parameter; annars måste en analysteknik som är specifik för testkemikalien användas. För dispersioner krävs centrifugering av proverna. För varje ny sats bör mätning göras av DOC, COD eller testkemikalien med specifik analys.

▼M4

32. Bestäm stamlösningens pH. Extremvärden tyder på att tillsats av kemikalien kan påverka pH-värdet för det aktiverade slammet i testsystemet. I så fall bör stamlösningen neutraliseras till pH 7 ± 0,5 med små mängder oorganisk syra eller bas, men utfällning av testkemikalien bör undvikas.

FÖRFARANDE

33. Beskrivningen av förfarandet gäller för aktivslamenheter, och förfarandet måste i viss mån anpassas för Porous Pot-system.

Förberedning av inokulat

34. Inokulera testsystemet i början av testet med aktiverat slam eller ett inokulat med låg koncentration av mikroorganismer. Håll inokulatet luftat vid rumstemperatur fram tills det används (inom 24 timmar). Ta i det första fallet ett prov av aktiverat slam från luftningstanken vid ett välskött biologiskt reningsverk eller en laboratorieanläggning som i huvudsak tar emot avloppsvatten från hushåll. Om nitrifikationsförhållanden ska simuleras, ta slam från ett reningsverk med nitrifikation. Bestäm halten suspenderade fasta ämnen och koncentrera vid behov slammet genom sedimentering så att den volym som tillsätts testsystemet är minimal. Se till att startkoncentrationen torrsubstans är kring 2,5 g/l.

35. Ta i det andra fallet 2–10 ml/l av utflödet från ett biologiskt reningsverk för avloppsvatten från hushåll som inokulat. För att få så många olika slags bakterier som möjligt kan inokulat tillsättas från flera olika källor, t.ex. ytvatten. I detta fall utvecklas och växer det aktiverade slammet i testsystemet.

Dosering av organiskt medium

36. Se till att inflödes- och utflödesbehållarna och rören från inflödeskärl och till utflödeskärl rengörs omsorgsfullt för att eliminera mikrobtillväxt initialt och under hela testet. Montera testsystemet i ett temperaturkontrollerat rum (i regel 20–25 °C) eller använd testenheter med mantel. Förbered en tillräcklig volym av det organiska medium som ska användas (punkterna 27–29). Fyll först luftningskärlet och separatorn med det organiska mediet och tillsätt sedan inokulat (punkterna 34, 35). Starta luftningen för att hålla slammet suspenderat och i aerob status och börja dosera inflöde och återföra sedimenterat slam. Dosera organiskt medium ur lagringskärlen till test- och kontrollenheternas luftningskärl (punkterna 20, 21) och samla in utflödena i liknande lagringskärl. För att få den normala hydrauliska retentionstiden på 6 timmar ska det organiska mediet pumpas med 0,5 l/tim. För att kontrollera detta mäts den dagliga mängden organiskt medium som doseras, genom att notera minskningen av volymen medium i lagringskärlen. För att bestämma effekterna av intermittent utsläpp och chockbelastning av kemikalier behövs andra doseringssätt.

37. Om det organiska mediet förbereds för användning för en period längre än 1 dag behövs kylning vid cirka 4 °C eller andra lämpliga konserveringsmetoder för att förebygga mikrobtillväxt och biologisk nedbrytning utanför testenheterna (punkt 29). Om syntetiskt avloppsvatten används kan detta förberedas och förvaras vid cirka 4 °C som koncentrerad stamlösning (t.ex. 10-faldig koncentration jämfört med den normala, se punkt 28). Denna stamlösning kan sedan blandas omsorgsfullt med lämplig volym kranvatten före användning eller alternativt pumpas direkt medan lämplig mängd kranvatten pumpas separat.

▼M4

Dosering av testkemikalie

38. Tillsätt en lämplig volym stamlösning av testkemikalien (punkt 31) till lagringskärlet för inflöde eller dosera direkt med en separat pump till luftningskärlet. Den normala medelkoncentrationen av testkemikalie i inflödet ska vara mellan 10 och 20 mg/l DOC, och den högsta koncentrationen får inte överskrida 50 mg/l. Om testkemikalien har dålig vattenlöslighet eller om det sannolikt uppstår toxiska effekter, ska koncentrationen sänkas till 5 mg/l DOC eller lägre, men detta förutsätter att det finns en lämplig specifik analysmetod som kan användas (dispergerade testkemikalier som är dåligt vattenlösliga kan tillsättas med användning av speciella doseringstekniker, se tillägg 5).

39. Tillsättning av testkemikalie inleds efter en period under vilken systemet stabiliseras och det organiska mediets DOC avlägsnas effektivt (cirka 80 %). Det är viktigt att före tillsättningen av testkemikalie kontrollera att alla enheter arbetar lika effektivt, och om de inte gör det kan detta i regel avhjälpas genom att blanda de enskilda slammen och återfördela lika stora volymer till enheterna. När inokulat med cirka 2,5 g/l (torrvikt) aktiverat slam används, kan testkemikalien tillsättas från testets början, eftersom direkt tillsats av ökande mängder från början ger den fördelen att det aktiverade slammet bättre kan anpassa sig till testkemikalien. Oberoende av hur testkemikalien tillsätts, rekommenderas att relevant flödeshastighet och/eller volymerna i lagringskärl mäts regelbundet.

Hantering av aktiverat slam

40. Koncentrationen av fasta ämnen i aktiverat slam stabiliseras i regel under testets gång oberoende av vilket inokulat som används, inom gränserna 1–3 g/l (torrvikt), beroende på det organiska mediets kvalitet och koncentration, driftsbetingelserna, karaktären hos närvarande mikroorganismer och testkemikaliens påverkan.

41. Bestäm koncentrationen suspenderade fasta ämnen i luftningskärlen minst varje vecka och kassera överskottsslam för att bibehålla en koncentration på 1–3 g/l (torrvikt); alternativt se till att slammets medelålder hålls konstant, i regel 6–10 dagar. Om slamretentionstiden är t.ex. 8 dagar, bör varje dag 1/8 av volymen aktiverat slam i luftningskärlet avlägsnas och kasseras. Detta bör göras dagligen eller helst med användning av en automatisk intermittent arbetande pump. Att hålla koncentrationen suspenderade fasta ämnen konstant eller inom snäva gränser upprätthåller inte en konstant slamretentionstid, som är den variabel som avgör koncentrationen av testkemikalie i utflödet.

42. Avlägsna minst dagligen under testets gång allt slam som fastnat på luftningskärlets och separatorns väggar för att återföra slammet till suspensionen. Kontrollera och rengör regelbundet alla rör för att förebygga tillväxt av biofilm. Återför sedimenterat slam från separatorn till luftningskärlet, helst genom intermittent pumpning. I ett Porous Pot-system sker ingen återföring, men se till att rena innerkärl sätts in innan volymen i kärlen stiger betydligt (punkt 21).

43. I Husmann-enheter kan det förekomma dålig sedimentering och förlust av slam. Detta kan rättas till genom en eller flera av nedan förtecknade åtgärder, parallellt i test- och kontrollenheterna:

— Färskt slam eller flockningsmedel (t.ex. 2 ml/kärl med 50 g/l $FeCl_3$) kan tillsättas regelbundet, t.ex. varje vecka, men se till att $FeCl_3$ inte reagerar med eller leder till utfällning av testkemikalien.

▼M4

— Mammutpumpen kan ersättas med en peristaltisk pump som ger ett slamåterföringsflöde som ungefär motsvarar det inflöde som ska användas och ger utveckling av en anaerob zon i det sedimenterade slammet (mammutpumpens geometri begränsar minimiflödet återfört slam till cirka 12-faldigt jämfört med inflödet).

— Slammet kan pumpas intermittent från separatorn till luftningskärlet (t.ex. 5 minuter per 2,5 timmar för att återföra 1–1,5 l/tim.

— Ett giftfritt skumhämmande medel (t.ex. silikonolja) i minimikoncentration kan användas för att förhindra förlust genom skumbildning.

— Luft kan ledas genom slammet i separatorn i korta kraftiga strålar (t.ex. 10 sekunder per timme).

— Det organiska mediet kan doseras intermittent till luftningskärlet (t.ex. 3–10 minuter per timme).

Provtagning och analys

44. Mät regelbundet koncentrationen upplöst syre, temperatur och pH i det aktiverade slammet i luftningskärlen. Se till att det alltid finns tillräckligt med syre (> 2 mg/l) och att temperaturen hålls inom det rekommenderade intervallet (i regel 20–25 °C). Håll pH vid 7,5 ± 0,5 genom att dosera små mängder oorganisk bas eller syra till luftningskärlet eller till inflödet, eller genom att öka det organiska mediets buffertkapacitet (se punkt 27). Om nitrifikation inträffar produceras syra, och oxidationen av 1 mg N producerar cirka 7 mg CO_3^-. Mätningsfrekvensen beror på vilka parametrar som mäts och på systemets stabilitet, och kan variera mellan dagliga och veckovisa mätningar.

45. Mät DOC eller COD i inflödena till kontroll- och testkärlen. Mät testkemikaliens koncentration i testinflödet genom specifik analys eller uppskatta koncentrationen utifrån koncentrationen i stamlösningen (punkt 31), den använda volymen och mängden avloppsvatten som doseras in i testenheten. För att minska variationen hos koncentrationsdata rekommenderas att testkemikaliens koncentration beräknas.

46. Ta lämpliga prover från uppsamlat utflöde (t.ex. 24 timmars sammansatt prov) och filtrera genom ett membran med porstorlek 0,45 μm eller centrifugera vid cirka 40 000 m^2 i cirka 15 minuter. Centrifugering bör användas om filtreringen är svår att utföra. Bestäm DOC eller COD minst i duplikat för att mäta slutlig biologisk nedbrytning och vid behov primär biologisk nedbrytning genom en specifik analys av testkemikalien.

47. Bestämning av COD kan ge upphov till analysproblem vid låga koncentrationer och rekommenderas därför endast om den använda testkoncentrationen är tillräckligt hög (cirka 30 mg/l). För starkt adsorberande kemikalier rekommenderas också att mängden adsorberad kemikalie i slammet mäts med en analysteknik som är specifik för testkemikalien.

48. Provtagningsfrekvensen beror på testets förväntade tidslängd. Rekommenderad frekvens är tre gånger per vecka. När enheterna har börjat fungera effektivt, vänta minst 1 vecka och högst 6 veckor efter tillförsel av testkemikalien för att anpassningen ska nå stabila förhållanden (steady state). Försök få minst 15 giltiga värden från platåfasen (punkt 59), som normalt varar i 3 veckor, för utvärdering av testresultaten. Testet kan avslutas när tillräcklig elimineringsgrad nås (t.ex. > 90 %) och de 15 värden som representerar analyser som genomförts varje veckodag under 3 veckor finns att tillgå. Normalt ska testet inte pågå längre än 12 veckor från tillsättning av testkemikalien.

▼M4

49. Om slammet nitrifieras och testkemikaliens effekter på nitrifikationen ska undersökas, bör prover från utflödet från test- och kontrollenheterna analyseras minst en gång per vecka

50. Alla analyser bör utföras så snart som möjligt, särskilt kvävebestämningarna. Om analyser måste senareläggas bör proverna förvaras i mörker vid cirka 4 °C i helt fyllda och tätt förslutna flaskor. Om proverna måste förvaras längre än 48 timmar bör de konserveras genom djupfrysning, syrabehandling (t.ex. 10 ml/l av en 400 g/l-svavelsyralösning) eller genom tillsats av lämpligt gift (t.ex. 20 ml/l av en 10 g/l-lösning av kvicksilver(II) klorid). Se till att konserveringstekniken inte påverkar analysresultaten.

Koppling av testenheter

51. Om koppling används (tillägg 3) bör samma mängd aktiverat slam (150–1 500 ml för luftningstankar som innehåller 3 liter vätska) dagligen bytas mellan testenhetens luftningskärl och kontrollenheten. Om testkemikalien adsorberas starkt på slammet, bör endast separatorernas supernatant bytas. I båda fallen bör en korrektionsfaktor användas för beräkning av testresultaten (punkt 55).

DATA OCH RAPPORTERING

Behandling av resultaten

52. Beräkna procentandelen DOC- eller COD-eliminering av testkemikalien för varje tidpunktsrelaterad bedömning, genom följande ekvation:

$$D_t = \frac{C_s - (E - E_o)}{C_s} \times 100$$

där

D_t = % eliminering av DOC eller COD vid tidpunkten t,

C_s = DOC eller COD på grund av testkemikalien, helst uppskattat utifrån stamlösningen (mg/l),

E = uppmätt DOC- eller COD-värde i testutflödet vid tidpunkten t (mg/l),

E_o = uppmätt DOC- eller COD-värde i kontrollutflödet vid tidpunkten t (mg/l).

53. Graden av DOC- eller COD-eliminering i det organiska mediet i kontrollenheten bidrar till bedömningen av den biologiska nedbrytningsaktiviteten i det aktiverade slammet under testet. Den procentuella elimineringen kan beräknas genom följande ekvation:

$$D_B = \frac{C_M - E_o}{C_M} \times 100$$

där

D_B = % eliminering av DOC eller COD i det organiska mediet i kontrollenheten vid tidpunkten t,

C_M = DOC eller COD i det organiska mediet i kontrollenhetens inflöde (mg/l).

▼M4

Alternativt kan man beräkna procentuell eliminering av DOC eller COD som kan tillskrivas det organiska mediet plus testkemikalie i testenheten med följande ekvation:

$$D_T = \frac{C_T - E}{C_T} \times 100$$

där

D_T = % eliminering av DOC eller COD i totalt testinflöde,

C_T = DOC eller COD i totalt testinflöde eller beräknat utifrån stamlösningar (mg/l).

54. Beräkna elimineringen av testkemikalie som uppmätts med en specifik analysmetod vid varje bedömningstidpunkt, genom följande ekvation:

$$D_{ST} = \frac{S_i - S_e}{S_i} \times 100$$

där

D_{ST} = % primär eliminering av testkemikalien vid tidpunkten t,

S_i = uppmätt eller uppskattad koncentration av testkemikalien i testinflödet (mg/l),

S_e = uppmätt koncentration av testkemikalien i testutflödet vid tidpunkten t (mg/l).

55. Om kopplingsmodellen har använts, kompensera utspädningen av testkemikalien i luftningskärlet genom slamutbytet med användning av en korrigeringsfaktor (se tillägg 3). Om genomsnittlig retentionstid på 6 timmar och utbyte av halva volymen aktiverat slam i luftningskärlet har använts, måste de fastställda dagliga eliminationsvärdena (D_t, punkt 52) korrigeras för att få den faktiska elimineringsgraden D_{tc} för testkemikalien genom följande ekvation:

$$D_{tc} = \frac{4D_t - 100}{3}$$

Presentation av testresultat

56. Plotta en kurva med procentuell eliminering D_t (eller D_{tc}) och D_{st} (om tillgänglig) mot tiden (se tillägg 2). Kurvan för eliminering av testkemikalien (i sig eller som DOC) kan ge underlag för vissa slutsatser om elimineringsprocessen.

Adsorption

57. Om kraftig DOC-eliminering observeras från början av testet, är det sannolikt att testkemikalien elimineras genom adsorption på det aktiva slammets fasta beståndsdelar. Detta kan påvisas genom att bestämma adsorberad testkemikalie genom specifik analys. Det är inte vanligt att elimineringen av DOC för adsorberbara kemikalier förblir kraftig genom hela testet; elimineringen är i regel kraftig i början för att sedan minska gradvis till ett jämviktsvärde. Om däremot den adsorberbara testkemikalien på ett eller annat sätt kan orsaka acklimatisering av den mikrobiella populationen, stiger testkemikaliens DOC-eliminering därefter och når ett högt platåvärde.

▼M4

Lagfas

58. På samma sätt som vid statiska screeningtest, kräver många testkemikalier en lagfas innan full biologisk nedbrytning inträffar. Under lagfasen sker acklimatisering eller anpassning av de nedbrytande bakterierna praktiskt taget utan eliminering av testkemikalien vid bakterietillväxtens inledande skede. Denna fas upphör och nedbrytningsfasen anses börja när cirka 10 % av den inledande mängden testkemikalie har eliminerats (efter att adsorption fått ske, i förekommande fall). Lagfasen är ofta mycket varierande och svår att reproducera.

Platåfas

59. Platåfasen i en elimineringskurva för ett kontinuerligt test definieras som den fas då maximal nedbrytning sker. Platåfasen bör pågå minst 3 veckor och ska ge cirka 15 uppmätta valida värden.

Genomsnittlig elimineringsgrad för testkemikalien

60. Beräkna medelvärdet utifrån testkemikaliens elimineringsvärden (D_t) under platåfasen. Avrundat till närmaste heltal (i %) är detta testkemikaliens elimineringsgrad. Likaså rekommenderas beräkning av medelvärdets 95 % konfidensintervall.

Eliminering av organiskt medium

61. Plotta det organiska mediets procentuella eliminering av DOC eller COD i kontrollenheten (D_B) mot tid. Ange genomsnittlig elimineringsgrad på samma sätt som för testkemikalien (punkt 60).

Indikation på biologisk nedbrytning

62. Om testkemikalien inte adsorberas i betydlig grad på det aktiverade slammet och elimineringskurvan har den typiska formen för en biologisk nedbrytningskurva med lagfas, kan nedbrytnings- och platåfaserna (punkterna 58, 59) med säkerhet tillskrivas biologisk nedbrytning. Om det har förekommit stark inledande eliminering kan simulationstestet inte användas för att skilja mellan biologiska och abiotiska elimineringsprocesser. I sådana fall, och i andra fall med tvivel rörande biologisk nedbrytning (t.ex. vid strippning), bör en analys göras rörande adsorberade testkemikalier eller ytterligare test med statisk biologisk nedbrytning genomföras baserade på parametrar som klart indikerar biologiska processer. Sådana test är syreupptagningsmetoder (kapitel C.4 D, E och F i denna bilaga (6)) eller test med mätning av koldioxidproduktion (kapitel C.4 C i denna bilaga (6)) eller ISO Headspace-metoden (18), med användning av förexponerat inokulat från simulationstestet. Om både DOC-eliminering och eliminering av specifik kemikalie har uppmätts och det finns betydande skillnader mellan elimineringsgraderna (DOC-elimineringen är lägre), tyder detta på att utflödena innehåller intermediära organiska produkter som kan vara svårare att bryta ned än den ursprungliga kemikalien.

Testresultatens giltighet

63. Information om inokulatets normala bionedbrytningsmönster fås genom en bestämning av det organiska mediets elimineringsgrad (punkt 53) i kontrollenheten. Testet kan anses vara giltigt om graden av DOC- eller COD-eliminering i kontrollenheten (-enheterna) är > 80 % efter två veckor och inget ovanligt har observerats.

▼M4

64. Om en lätt biologiskt nedbrytbar (referens)kemikalie har använts, bör graden av biologisk nedbrytning (D_t, punkt 52) vara > 90 %.

65. Om testet genomförs under nitrifierande förhållanden bör medelkoncentrationen i utflödena vara < 1 mg/l ammoniumkväve och < 2 mg/l nitritkväve.

66. Om dessa kriterier (punkterna 63–65) inte uppfylls, upprepa testet med inokulat från en annan källa, testa en referenskemikalie och se över alla försöksförfaranden.

Testrapport

67. Testrapporten ska innehålla följande information:

Testkemikalie:

— Identifieringsdata.

— Fysikalisk natur och, när det är relevant, fysikalkemiska egenskaper.

Testbetingelser:

— Typ av testsystem och eventuella modifikationer för testning av olösliga och flyktiga kemikalier.

— Typ av organiskt medium.

— Andel av och egenskaper hos industriellt avloppsvatten som ingår, om kända.

— Inokulat, egenskaper och provtagningsplats(er), koncentration och eventuell förbehandling.

— Stamlösning av testkemikalien: DOC- och TOC-innehåll, i förekommande fall beredningssätt för suspension, använd testkoncentration, motivering om denna ligger utanför området 10–20 mg/l DOC, tillsättningsmetod, datum för första tillsättning, eventuella ändringar.

— Slammets medelålder och medelvärde för hydraulisk retentionstid, metod för kassering av slam, metoder för att undvika klumpbildning, förlust av slam osv.

— Analystekniker som använts.

— Testtemperatur.

— Slammets klumpbildningsegenskaper, slammets volymindex (SVI), suspenderad halt (MLSS).

— Avvikelser från standardförfaranden och alla omständigheter som kan ha påverkat resultaten.

Testresultat:

— Alla uppmätta data (DOC, COD), specifika analyser, pH, temperatur, syrehalt, suspenderade fasta ämnen, kvävekemikalier om relevant.

— Alla beräknade värden för D_t (eller D_{tc}), D_B och D_{St} i tabellform samt elimineringskurvor.

— Information om lag- och platåfaserna, testets tidslängd, elimineringsgrad för testkemikalien och för det organiska mediet i kontrollenheten, tillsammans med statistiska data och utlåtanden om biologisk nedbrytbarhet och testets giltighet.

— Diskussion om resultaten.

▼**M4**

LITTERATUR

(1) Swisher R. D. (1987), ”Surfactant Biodegradation”, andra utgåvan, Marcel Dekker Inc. New York, s. 1085.

(2) Tyska regeringen (1962). ”Ordinance of the degradability of detergents in washing and cleaning agents”, *Bundesgesetzblatt*, Pt.1 nr 49, s. 698–706.

(3) Painter H. A. och King E. F. (1978a), ”WRc porous-pot method for assessing biodegradability”, *Technical Report No.70*, Water Research Centre, Medmenham, UK.

(4) Painter H. A. och King E. F. (1978b), ”The effect of phosphate and temperature on growth of activated sludge and on biodegradation of surfactants”, *Wat. Res.* 12, s. 909–915.

(5) Eckenfelder, W. W, (19), US EPA.

(6) Kapitel C.4 i denna bilaga, Bestämning av ”lätt” bionedbrytbarhet.

(7) Kapitel C.12 i denna bilaga, Biologisk nedbrytbarhet – Modifierat SCAS-test.

(8) Kapitel C.19 i denna bilaga, Uppskattning av adsorptionskoefficienten (K_{oc}) i jord och avloppsslam med användning av högtrycksvätskekromatografi (HPLC).

(9) Gerike P. och Fischer W. K. (1979), ”A correlation study of biodegradability determinations with various chemicals in various tests”, *Ecotox. Env. Saf.*, 3, s. 157–173.

(10) Gerike P. och Fischer W. K. (1981), som (9), ”II Additional results and conclusions”, *Ecotox. Env. Saf.*, 5, s. 45–55.

(11) Painter H. A. och Bealing D. (1989), ”Experience and data from the OECD activated sludge simulation test”, s. 113–138, ”Laboratory tests for simulation of water treatment processes”, *CEC Water Pollution Report 18*, Red. Jacobsen B. N., Muntau H., Angeletti G.

(12) ISO 11733 (1995; reviderad 2004), ”Evaluation of the elimination and biodegradability of organic substances in an aqueous medium – activated sludge simulation test”.

(13) Birch R. R. (1982), ”The biodegradability of alcohol ethoxylates”, XIII Jornado Com. Espanol. Deterg., s. 33–48.

(14) Birch R. R. (1984), ”Biodegradation of noniomic surfactants”, *J.A.O.C.S.* 61 (2), s. 340–343.

(15) Gerike P., Fischer W. K. och Holtmann W. (1980), ”Biodegradability determinations in trickling filter units compared with the OECD confirmatory test”, *Wat.Res.* 14, s. 753–758.

(16) Baumann U., Kuhn G. och Benz M. (1998), ”Einfache Versuchsanordnung zur Gewinnung gewässerökologisch relevanter Daten, UWSF - Z”, *Umweltchem. Ökotox*, 10, s. 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”.

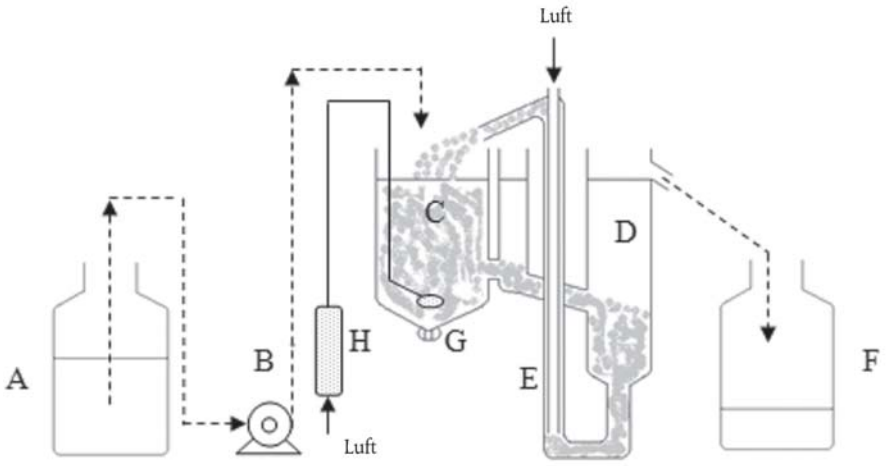
▼M4

Tillägg 1

Figur 1

Utrustning för undersökning av biologisk nedbrytning

Husmann-enhet



A. Förvaringskärl

B. Doseringspump

C. Luftningskammare (kapacitet 3 l)

D. Sedimenteringskärl

E. Mammutpump

F. Uppsamlingskärl

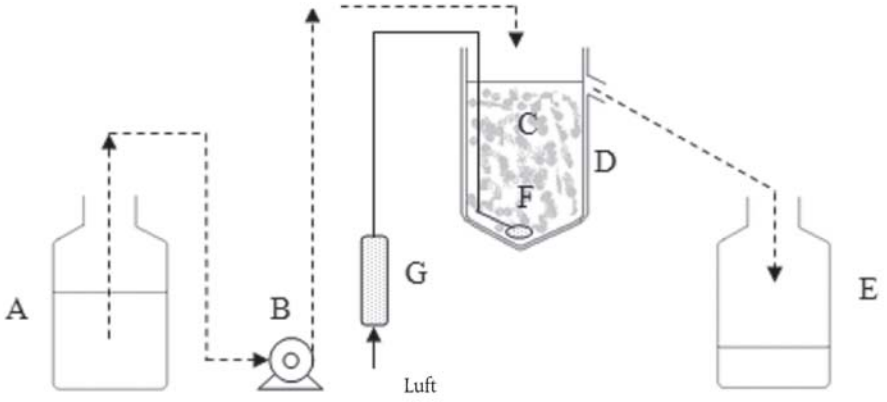
G. Luftningssystem

H. Luftflödesmätare

Figur 2

Utrustning för undersökning av biologisk nedbrytning

Porous Pot-enhet



A. Förvaringskärl

B. Doseringspump

C. Poröst luftningskärl

D. Yttre ogenomträngligt kärl

E. Uppsamlingskärl

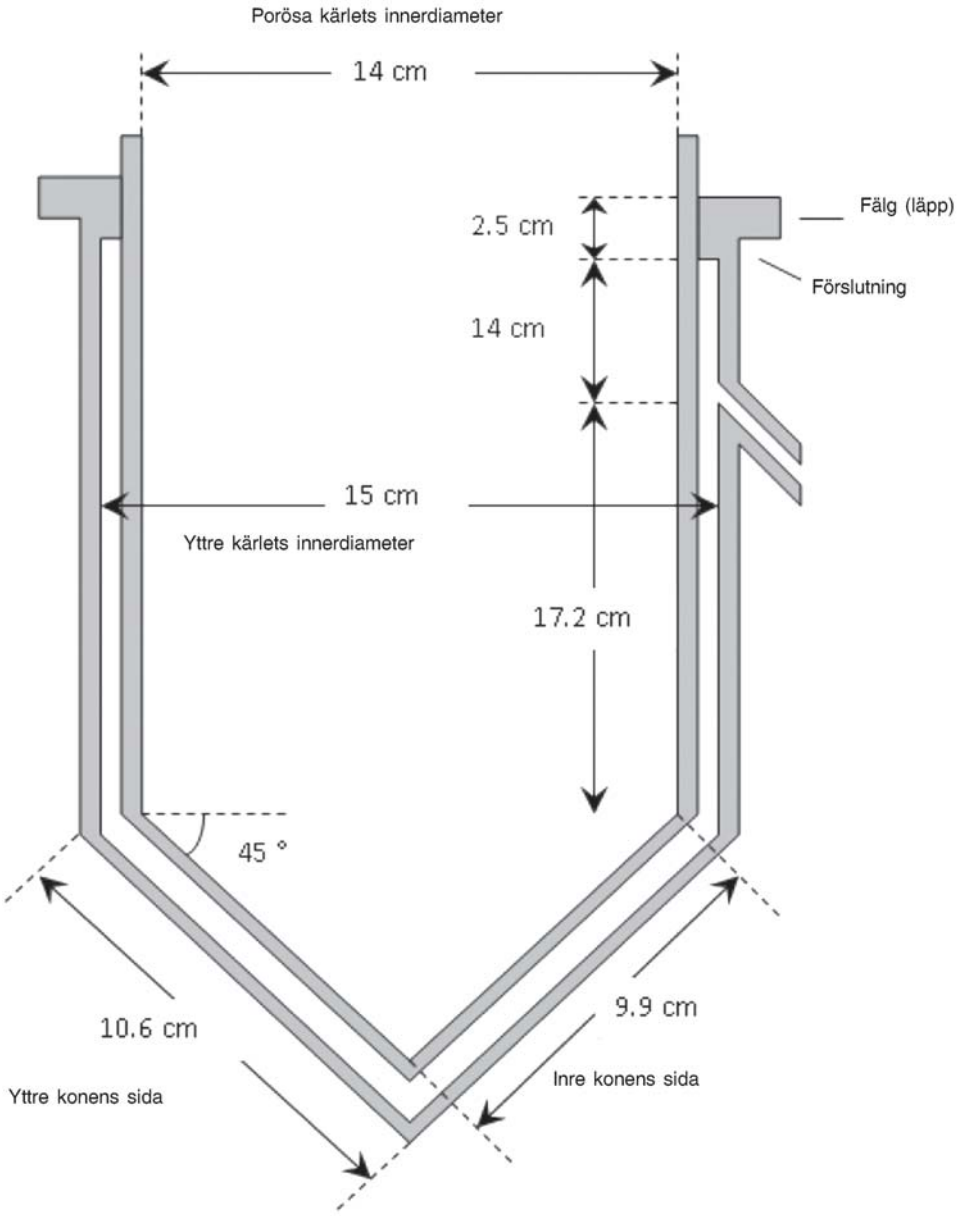
F. Diffusör

G. Luftflödesmätare

▼M4

Figur 3

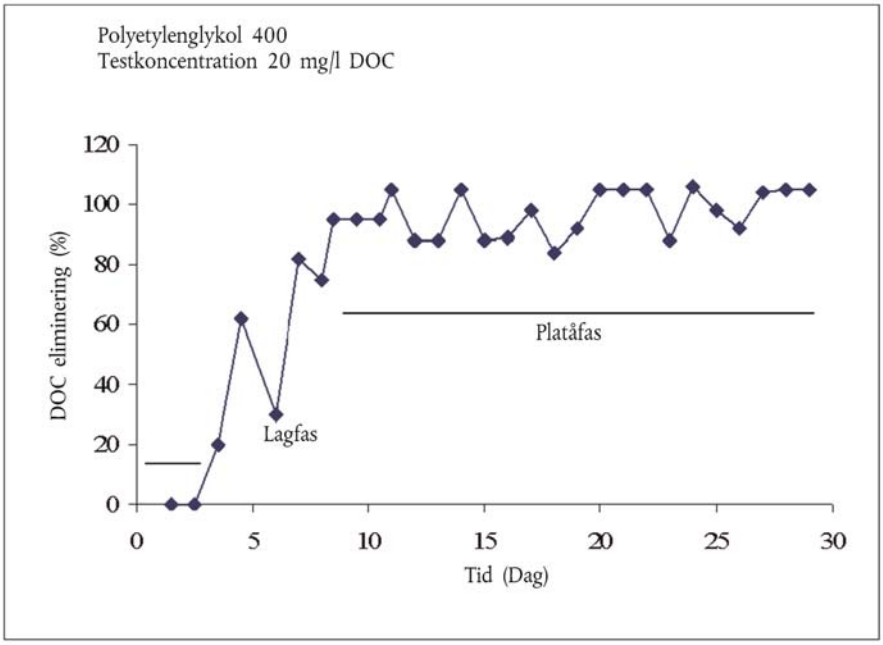
Detaljbeskrivning av Porous Pot-enhetens luftningskärl (3 l)



▼**M4**

Tillägg 2

Exempel på en elimineringskurva



▼M4

Tillägg 3

[SOM INFORMATION]

KOPPLING AV TESTENHETER

För att försöka likställa de mikrobiella populationerna i testenheten som matas med avloppsvatten plus testkemikalie och kontrollenheten som endast matas med avloppsvatten, har man infört dagligt utbyte av slam (1). Förfarandet kallas koppling och metoden kallas kopplade enheter. Koppling gjordes till en början med Husmann-enheter för aktiverat slam men har också gjorts med Porous Pot-enheter (2) (3). Inga betydande skillnader i resultat erhölls mellan icke-kopplade och kopplade enheter (Husmann eller Porous Pots) och det är därför onödigt att använda tid och resurser på koppling av enheter.

Utbyte av slam kan ge bilden av rätt betydande eliminering, eftersom en del av testkemikalien överförs och koncentrationen av testkemikalie i test- och kontrollutflödena blir nästan densamma. Därför måste korrigeringsfaktorer användas, vilka är beroende av den fraktion som utbyts och den genomsnittliga hydrauliska retentionstiden. Närmare detaljer om beräkningen har publicerats (1).

Beräkna den korrigerade DOC- eller COD-elimineringsgrader med användning av följande allmänna formel:

$$D_{tc} = (D_t - 100 \cdot a \cdot r/12)/(1 - a \cdot r/12)\ \%$$

där

D_{tc} = korrigerad procentuell DOC- eller COD-eliminering,

D_t = fastställd procentuell DOC- eller COD-eliminering,

a = utbytesfraktion av volymen i enheterna för aktiverat slam,

r = genomsnittlig hydraulisk retentionstid (tim).

Om t.ex. hälften av volymen i luftningskärlet byts ut (a = 0,5) och den genomsnittliga hydrauliska retentionstiden är 6 timmar, är den korrekta formeln följande:

$$D_{tc} = \frac{4D_t - 100}{3}$$

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, s. 1131–1135.

(2) Painter H. A. och Bealing D. J. (1989), ”Experience and data from the OECD Activated Sludge Simulation Test”, s. 113–138, ingår i Laboratory Tests for Simulation of Water Treatment Processes CEC Water Pollution Report 18, Red. Jacobsen B. N., Muntau H., Angeletti G.

(3) Painter H. A., King E. F. (1978), ”Water Research Centre Porous Pot Method for Assessing Biodegradability”, Technical Report TR70, Water Research Centre, Stevenage, UK.

▼M4

Tillägg 4

UTVÄRDERING AV INHIBERING AV AKTIVERAT SLAM

Förfarande med testkemikalier

1. En kemikalie (eller ett avloppsvatten) bryts eventuellt inte ned eller elimineras i simuleringstest och kan t.o.m. ha en inhiberande effekt på slammets mikroorganismer. Övriga kemikalier är biologisk nedbrytbara i låga koncentrationer men har inhiberande verkan i högre koncentrationer (hormesis). Inhiberande effekter har kanske framkommit på ett tidigare skede eller kan bestämmas med hjälp av toxicitetstest, med användning av liknande eller identiskt inokulat som används vid simuleringstest (1). Sådana metoder är inhibering av syreupptagning (kapitel C.11 i denna bilaga (2) och ISO 8192 (3)) eller inhibering av tillväxt av mikroorganismer i aktiverat slam (ISO 15522 (4)).

2. Vid simuleringstest framgår inhibering genom att skillnaden mellan upplöst organiskt kol (DOC) eller kemisk syreförbrukning (COD) mellan utflödet från testkärlet och utflödet från kontrollkärlet är större än det DOC som tillsatts i form av testkemikalie. Detta kan även uttryckas som att den procentuella elimineringen av DOC (och biokemisk syreförbrukning BOD, kemisk syreförbrukning COD och/eller NH^{+}_{4}) i det organiska mediet minskar när testkemikalie har tillsatts. Om detta inträffar bör testet upprepas med lägre koncentration av testkemikalien tills man når en nivå där ingen inhibering inträffar och därefter eventuellt ytterligare sänka koncentrationen tills testkemikalien har brutits ned biologiskt. Om däremot testkemikalien (eller avloppsvattnet) påverkar processen negativt vid alla testade koncentrationer, tyder detta på att kemikalien är svår eller omöjlig att behandla biologiskt, även om det kan vara värt att upprepa testet med aktiverat slam från en annan källa och/eller låta slammet acklimatisera sig mer gradvis.

3. Omvänt gäller att om testkemikalien bryts ned biologiskt vid första försöket i ett simuleringstest bör koncentrationen ökas, om det är nödvändigt att få information om huruvida kemikalien fungerar inhiberande.

4. Vid bestämning av inhiberingsgraden bör man komma ihåg att populationen i det aktiverade slammet kan ändras så att mikroorganismerna med tiden utvecklar tolerans mot en inhiberande kemikalie.

5. Beräkning av inhiberingsgraden:

   Den totala procentuella elimineringen R_o, av BOD, DOC, COD osv. för test- och kontrollenheterna kan beräknas genom följande:

$$R_o = 100\ (I - E)/I\ \%$$

   där:

   I = inflödeskoncentrationen för BOD, DOC, COD osv. för test- eller kontrollkärl (mg/l),

   E = respektive utflödeskoncentrationer (mg/l).

   I och E måste korrigeras för DOC på grund av testkemikalien i testenheterna, annars får man inte rätt resultat från beräkningen av procentuell inhibering.

▼**M4**

Graden av inhibering orsakad av testkemikalien kan beräknas genom följande:

$$\% \text{ inhibering} = 100\ (R_c - R_t)/R_c$$

där:

R_c = procentuell eliminering i kontrollkärlen,

R_t = procentuell eliminering i testkärlen.

LITTERATUR

(1) Reynolds L. m.fl. 1987), ”Evaluation of the toxicity of substances to be assessed for biodegradability”, *Chemosphere* 16: 2259.

(2) Kapitel C.11 i denna bilaga, Biologisk nedbrytbarhet – Aktiverat slam – respirationshämningstest.

(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

Tillägg 5

Dåligt vattenlösliga kemikalier, flyktiga kemikalier

Dåligt vattenlösliga kemikalier

Det verkar finnas få publicerade rapporter rörande test som simulerar vattenrening och omfattar kemikalier med dålig eller ingen löslighet i vatten (1) (2) (3).

Det finns ingen enskild metod för dispergering av testkemikalie som kan tillämpas på alla olösliga kemikalier. Två av de fyra typer av metoder som beskrivs i ISO 10634 (4) verkar vara lämpliga för att dispergera testkemikalier för simuleringstest – användning av emulgeringsmedel och/eller ultraljud. Den resulterande dispersionens stabilitet bör fastställas under minst 24 timmar. Lämpligt stabiliserade dispersioner i en behållare med kontinuerlig omrörning (punkt 38) kan därefter doseras till luftningskärlet separat från avloppsvatten från hushåll (eller syntetiskt avloppsvatten).

Om en dispersion är stabil bör man undersöka hur testkemikalien kan bestämmas i den dispergerade formen. Det är sannolikt inte lämpligt med DOC, vilket betyder att en specifik analysmetod för testkemikalien bör etableras som kan användas på utflöde, utflödets fasta ämnen och aktiverat slam. Därefter fastställs vad som händer med testkemikalien vid simulering av aktivslamprocessen, i vätskeform och fast form. Då kan en ”massbalans” etableras för att fastställa huruvida det har skett biologisk nedbrytning av testkemikalien. Detta ger dock endast indikation på primär biologisk nedbrytning. Man bör försöka demonstrera slutlig biologisk nedbrytning genom att tillämpa respirometritest för lätt bionedbrytbarhet (kapitel C.4 i denna bilaga (5) C, F eller D) med inokulat i form av slam som exponerats för testkemikalien i simuleringstestet.

Flyktiga kemikalier

Simulering av avloppsvattenrening på flyktiga kemikalier är både diskutabelt och problematiskt. På samma sätt som för dåligt vattenlösliga testkemikalier tycks det även för flyktiga kemikalier ha publicerats mycket få rapporter som beskriver simuleringstest. En konventionell typ av apparatur för fullständig blandning kan anpassas genom att försegla luftnings- och sedimenteringskärlen, och därefter mäta och kontrollera luftflödet med flödesmätare och låta utloppsgasen passera genom fällor för uppsamling av flyktigt organiskt material. I vissa fall används vakuumpump för att dra utloppsgasen genom en ”kall” fälla eller purge-trap som innehåller Tenax och silikagel för gaskromatografianalyser. Testkemikalien i fällan kan bestämmas analytiskt.

Testet genomförs i två delar. Först körs enheterna utan slam men med syntetiskt avloppsvatten plus testkemikalie som pumpas in i luftningskärlet. Prover tas av inflöde, utflöde och utloppsgas och analyseras för testkemikalien under några dagar. Utifrån insamlade data kan procentandelen testkemikalie (R_{vs}) som strippats ur systemet beräknas.

Därefter genomförs normalt biologiskt test (med slam) under liknande förhållanden som använts vid strippningen. Likaså mäts DOC eller COD för att kontrollera att enheterna fungerar effektivt. Mängden testkemikalie i inflöde, utflöde och utloppsgas bestäms då och då under testets första fas, och efter acklimatiseringen mer frekvent. Utifrån de data som fås under steady state kan procentandelen eliminerad testkemikalie från vätskefasen i alla processer (R_T) (fysisk och biologisk eliminering) beräknas, såväl som andelen (R_V) som strippats från systemet.

▼M4

Beräkning:

a) Vid icke-biologiskt test kan procentandelen (R_{VP}) testmaterial som strippats från systemet beräknas genom följande:

$$R_{VP} = \frac{S_{VP}}{S_{IP}} \cdot 100$$

där

R_{VP} = eliminering av testkemikalie genom avdunstning (%),

S_{VP} = testkemikalie som uppsamlats i en fälla, uttryckt som ekvivalent koncentration i vätskefasen (mg/l),

S_{IP} = testkemikaliens koncentration i inflödet (mg/l).

b) Vid biologiskt test kan procentandelen (R_V) testmaterial som strippats från systemet beräknas genom följande:

$$R_V = \frac{S_V}{S_I} \cdot 100$$

där

R_V = eliminering av testkemikalie genom avdunstning i biologiskt test (%),

S_V = testkemikalie som uppsamlats i en fälla i biologiskt test, uttryckt som ekvivalent koncentration i vätskeformigt inflöde (mg/l),

S_I = testkemikaliens koncentration i inflödet (mg/l).

c) Vid biologiskt test beräknas procentandelen testkemikalie (R_T) som eliminerats genom alla processer genom följande:

$$R_T = 1 - \frac{S_E}{S_I} \cdot 100$$

där

S_E = koncentrationen testkemikalie i (vätskeformigt) utflöde (mg/l).

d) Då kan procentandelen (R_{BA}) som eliminerats genom bionedbrytning plus adsorption beräknas genom följande:

$$R_{BA} = (R_T - R_V)$$

Separata test bör göras för att fastställa om testkemikalien har adsorberats och i så fall kan ytterligare korrigering göras.

e) En jämförelse mellan andelen testkemikalie som strippats från systemen för biologiskt test (R_v) och icke-biologiskt test (R_{vp}) indikerar den totala effekt som den biologiska behandlingen har haft på utsläpp av testkemikalien i atmosfären.

Exempel: Bensen

Slamretentionstid = 4 dagar

Syntetiskt slam, retentionstid 8 timmar

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 % och R_{BA} = 85 %.

Det antas att bensen inte adsorberas på slammet.

LITTERATUR

(1) Horn J. A., Moyer J. E., Hale J.H. (1970), ”Biological degradation of tertiary butyl alcohol”, Proc. 25th Ind. Wastes Conference Purdue Univ., s. 939–854.

(2) Pitter P., Chudoba J. (1990), ”Biodegradability of organic substances in the aquatic environment”, CRC Press, Boston, Förenta staterna.

(3) Stover E. L., Kincannon D. F. (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 denna bilaga, Bestämning av ”lätt” bionedbrytbarhet.

▼M4

Tillägg 6

Slamretentionstidens (SRT) inverkan på reningsmöjligheterna för en kemikalie

INLEDNING

1. Den metod som beskrivs i huvudtexten syftar till att fastställa om de kemikalier som testas (i regel kemikalier som veterligen är inherent, men inte lätt, bionedbrytbara) kan brytas ned biologiskt inom de gränser som gäller i avloppsreningsverk. Resultaten uttrycks som procentandel eliminering och procentandel biologisk nedbrytning. Driftsbetingelserna i aktivslamenheterna och valet av inflöde kan ge rätt stora variationer vad gäller koncentrationen av testkemikalie i utflödet. Testerna genomförs vanligen med endast en nominell koncentration av fasta ämnen i slammet eller en nominell slamretentionstid (SRT) och de beskrivna systemen för slamkassering kan leda till att SRT-värdet varierar betydligt under testet, både från dag till dag och under en dag.

2. I denna variant (1) (2) kontrolleras SRT med mycket snävare gränser under varje 24-timmarsperiod (på samma sätt som i full skala), vilket ger en mer konstant koncentration i utflödena. Avloppsvatten från hushåll rekommenderas eftersom det ger enhetligare och högre procentandel eliminering. Dessutom undersöks verkningarna av ett antal SRT-värden och i en mer detaljerad studie kan verkningarna av ett urval temperaturer på utflödeskoncentrationen fastställas.

3. Det finns fortfarande inget allmänt samförstånd om vilken kinetisk modell som gäller när kemikalier bryts ned biologiskt under de förhållanden som råder vid avloppsvattenrening. Monod-modellen för bakteriell tillväxt och substratanvändning valdes (1) (2) för behandling av insamlade data, eftersom metoden endast var avsedd att tillämpas på kemikalier tillverkade i stora volymer som leder till en koncentration över 1 mg/l i avloppsvattnet. Den förenklade modellens giltighet och de antaganden som gjordes fastställdes genom användning en serie alkoholetoxylat med varierande grader av primär bionedbrytbarhet (2) (3).

Anmärkning: Denna metodvariant påminner mycket om testmetod C.10-A och nedan anges endast de detaljer som avviker.

PRINCIP FÖR TESTMETODEN

4. Porous Pot-enheter för aktiverat slam utformade för att ge (nästan) kontinuerlig kassering av blandad vätska, vilket möjliggör en mycket exakt kontroll av slamretentionstiden (SRT eller θ_s), körs i icke-kopplat läge med ett urval olika slamretentionstider och, alternativt, med ett urval olika temperaturer. Retentionstiden är i regel 2–10 dagar och temperaturen mellan 5 och 20 °C. Avloppsvattnet, helst från hushåll, och en lösning av testkemikalien doseras separat till enheterna med ett flöde som ger den önskade retentionstiden (3–6 timmar) och önskad koncentration av testkemikalien i inflödet. Kontrollenheter som inte matas med testkemikalie körs parallellt för jämförande ändamål.

5. Olika typer av apparatur kan användas, men stor vikt bör fästas vid att säkerställa god kontroll av slamretentionstiden. Om den utrustning som används t.ex. innehåller ett sedimenteringskärl, kan det vara nödvändigt att räkna med förlust av fasta ämnen via utflödet. Dessutom bör speciella försiktighetsmått vidtas för att undvika fel på grund av variationer av mängden slam i sedimenteringskärlet.

▼M4

6. Enheterna körs vid var och en av de olika betingelser som har valts, och efter att jämvikt har nåtts fås genomsnittliga steady state-koncentrationer av testkemikalie i utflödena, och alternativt DOC, under en period som omfattar cirka tre veckor. Utöver bedömning av procentandelen eliminering för testkemikalie, och alternativt DOC, fås förhållandet mellan driftsbetingelserna och koncentrationen i utflödet uttryckt i grafisk form. Utifrån detta kan preliminära kinetiska konstanter beräknas och prognoser för de betingelser under vilka testkemikalien kan behandlas.

INFORMATION OM TESTKEMIKALIEN

7. Se kapitel C.10 A, punkterna 12 och 13.

GODKÄNNANDENIVÅER

8. Se kapitel C.10 A, punkterna 14 och 15.

REFERENSKEMIKALIE

9. Se kapitel C.10 A, punkt 16.

TESTRESULTATENS REPRODUCERBARHET

10. Se kapitel C.10 A, punkterna 17 och 18.

METODBESKRIVNING

Apparatur

11. Lämplig enhet är ett modifierat Porous Pot-system (tillägg 6.1). Det består av ett inre kärl konstruerat av poröst polypropen med tjocklek på 3,2 mm och porstorlek på cirka 90 μm, med stumsvetsad söm (detta ger en robustare enhet än den som beskrivs i punkt 21 i detta kapitel C.10 A). Innerkärlet omsluts av ett ogenomträngligt ytterkärl av polyetylen som består av två delar: en rund bas med hål för två luftkanaler och en slamkasseringskanal, och en övre cylinder som är skruvad på basen och vars utlopp är placerat så att Porous Pot-kärlet får en känd volym på 3 liter. En av luftkanalerna har en diffusör och den andra är öppen och placerad i rät vinkel till diffusörens utlopp. Detta system ger den turbulens som krävs för att säkerställa att innehållet blandas fullständigt och att koncentrationerna av löst syre hålls över 2 mg/l.

12. Lämpligt antal enheter hålls vid kontrollerad temperatur mellan 5 och 20 °C (± 1 °C), antingen i vattenbad eller i utrymmen med konstant temperatur. Pumpar krävs för att dosera lösning av testkemikalie och sedimenterat avloppsvatten med önskat flöde (0–1,0 ml/min och 0–25 ml/min) och en tredje pump för att avlägsna överloppsslam från luftningskärlen. Den mycket låga flödeshastighet som krävs för överskottsslam nås genom att använda en pump ställd på högre flödeshastighet som körs intermittent med hjälp av en timer, t.ex. 10 sekunder per minut, så att en pumpinställning på 3 ml/min ger ett flöde på 0,5 ml/min.

Filtreringsapparatur eller centrifug

13. Se kapitel C.10 A, punkt 23.

Analysutrustning

14. Se kapitel C.10 A, punkt 24.

Vatten

▼M4

15. Se kapitel C.10 A, punkterna 25 och 26.

Organiskt medium

16. Se kapitel C.10 A, punkt 27.

Syntetiskt slam

17. Se kapitel C.10 A, punkt 28.

Avloppsvatten från hushåll

18. Se kapitel C.10 A, punkt 29.

Aktiverat slam

19. Se kapitel C.10 A, punkt 30.

Stamlösningar av testkemikalien

20. Se kapitel C.10 A, punkterna 31 och 32.

FÖRFARANDE

Förberedning av inokulat

21. Se kapitel C.10 A, punkt 34 (endast denna gäller) – använd aktiverat slam (cirka 2,5 g/l).

Antal testenheter

22. För ett enkelt test, dvs. för att mäta procentandelen eliminering, behövs bara en slamretentionstid (SRT). För att få de data som behövs för beräkning av preliminära kinetiska konstanter behövs däremot 4 eller 5 SRT-värden. Vanligen används retentionstider mellan 2 och 10 dagar. Det är i regel praktiskt att göra ett test med 4 eller 5 SRT-värden samtidigt vid en och samma temperatur. I mer omfattande studier kan samma SRT-värden, eller eventuellt ett annat urval värden, användas vid andra temperaturer inom området 5–20 °C. För primär bionedbrytning (huvudändamål) behövs i regel bara en enhet per uppsättning testbetingelser. Vid test av slutlig bionedbrytbarhet behövs dock en kontrollenhet för varje uppsättning testbetingelser; denna matas med enbart slam, inte testkemikalie. Om man tror att det finns testkemikalie i det slam som används, är det nödvändigt att använda kontrollenheter vid bedömning av primär biologisk nedbrytning och därefter göra nödvändiga korrigeringar i beräkningarna.

Dosering av organiskt medium och testkemikalie

23. Se kapitel C.10 A, punkterna 36–39, men notera att testkemikalielösningen doseras separat och att flera olika slamkasseringsgrader används. Det behövs också regelbunden övervakning (t.ex. två gånger om dagen) och vid behov justering, inom ± 10 %, av flödeshastigheterna för inflöden, utflöden och slamkassering. Om det uppstår svårigheter med analysmetoden när avloppsvatten från hushåll används, kan testet genomföras med syntetiskt avloppsvatten, men då måste man se till att olika media ger jämförbara kinetiska data.

Hantering av enheterna för aktiverat slam

24. Se kapitel C.10 A, punkterna 40–43, men SRT ska endast kontrolleras genom ”konstant” kassering av slam.

Provtagning och analys

25. Se kapitel C.10 A, punkterna 44–50, med undantag för att testkemikaliens koncentration måste bestämmas och bestämning av DOC är frivillig. COD ska inte användas.

▼M4

DATA OCH RAPPORTERING

Behandling av resultaten

26. Se kapitel C.10 A, punkterna 52–54.

Presentation av testresultat

27. Se kapitel C.10 A, punkterna 56–62.

Beräkning av kinetiska konstanter

28. Det är mera realistiskt att ange genomsnittlig steady state-koncentration av testkemikalien i utflödet och beskriva hur denna varierar enligt driftsbetingelserna än att ange procentuell primär bionedbrytning. Detta kan göras genom att beakta ekvation 6 i tillägg 6.2 som kan ge värden för K_S, μ_m och θ_{SC}, den kritiska slamretentionstiden.

(Alternativt kan ungefärliga värden för K_S och μm fås med hjälp av ett enkelt datorprogram för att anpassa den teoretiska kurvan som beräknats med ekvation 2 (tillägg 6.2) till de experimentella värdena. Även om ingen given lösning är unik, går det att få en rimlig approximering av K_S och μm.)

Resultatvariation

29. Den vanliga erfarenheten är att man får varierande värden för de kinetiska parametrarna för individuella kemikalier. Man tror att slammets odlingsbetingelser och de betingelser som gäller i det test som används (som i punkt 5 och i andra test) har en stor effekt på de värden som erhålls. En aspekt av denna variation har diskuterats av Grady m.fl. (4) som har föreslagit att termerna ”extant” and ”intrinsic” ska användas för de två extrema betingelser som representerar gränserna för den fysiologiska status som en odling kan ha under ett kinetiskt experiment. Om odlingens status inte tillåts variera under testet, återspeglar de kinetiska parametervärdena betingelserna i den miljö från vilken mikroorganismerna har tagits – för dessa värden används benämningen ”extant”, dvs. något som fortsatt existerar. Vid den andra yttersta gränsen är testbetingelserna sådana att de medger full utveckling av proteinsyntessystemet och därmed möjlighet till största möjliga tillväxt, och då används benämningen ”intrinsic” för de kinetiska parametrar som erhålls, dvs. de är endast beroende av substratets karaktär och typen av bakterier i odlingen. Som riktlinje kan sägas att ”extant”-värden fås när förhållandet mellan substratets koncentration och kompetenta mikroorganismer (S_o/X_o) hålls lågt, t.ex. 0,025, och ”intrinsic”-värden fås när förhållandet är högt, t.ex. minst 20. I båda fallen gör S_o bör vara samma eller högre än det relevanta värdet för Ks, halvmättnadskonstanten.

30. Variationen och andra aspekter rörande bionedbrytningens kinetik diskuterades nyligen vid en SETAC-workshop (5). Dessa studier, rapporterade och projekterade, bör ge en klarare uppfattning om den kinetik som fungerar i vattenreningsverk, och därmed en bättre tolkning av befintliga data och förslag till mer relevanta utformningar av nya testmetoder.

LITTERATUR:

(1) Birch R. R. (1982), ”The biodegradability of alcohol ethoxylates”, XIII Jornado Com. Espanol Deterg., s. 33–48.

(2) Birch R. R. (1984), ”Biodegradation of noniomic surfactants”, *J.A.O.C.S.*, 61(2), s. 340–343.

(3) Birch R. R. (1991), ”Prediction of the fate of detergent chemicals during sewage treatment”, *J. Chem. Tech. Biotechnol*., 50, s. 411–422.

▼**M4**

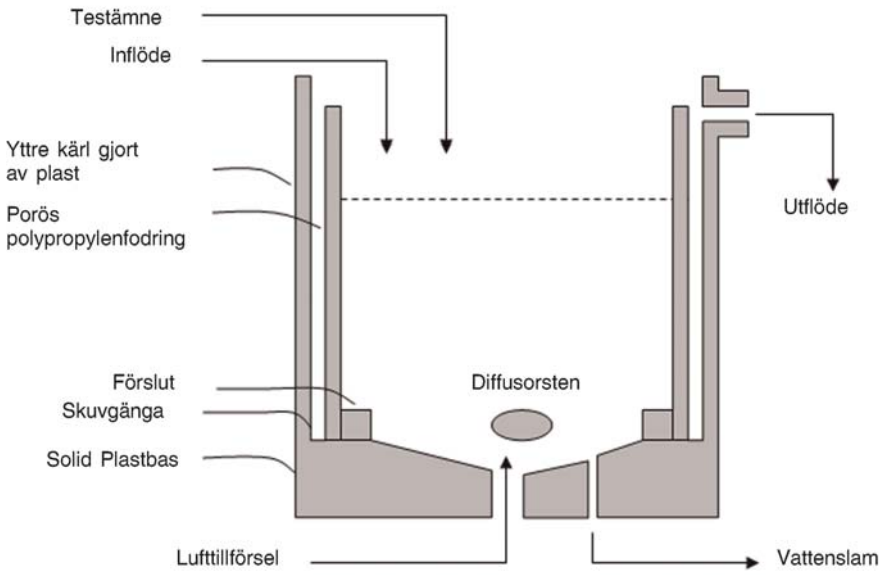
(4) Grady C. P. L., Smets B. F. och Barbeau D. S. (1996), ”Variability in kinetic parameter estimates: A review of possible causes and a proposed terminology”, *Wat. Res*., 30 (3), s. 742–748.

(5) ”Biodegradation kinetics: Generation and use of data for regulatory decision making (1997)”, Workshop at Port Sunlight, UK, red. Hales S. G., Feitjel T., King H., Fox K., Verstraete W., 4–6 september 1996. SETAC Europe, Bryssel.

▼M4

Tillägg 6.1

Porous Pot med SRT-kontroll



▼M4

Tillägg 6.2

Beräkning av kinetiska konstanter

1. Utifrån antagandet att Monod-kinetik kan tillämpas och med beaktande av en massbalans av aktiva fasta ämnen och substrat över systemet med aktiverat slam (1), kan man få steady state-uttryck enligt följande:

$$\frac{1}{\theta_s} = \frac{\mu_m \cdot S_1}{K_s + S_1} - K_d \qquad (1)$$

eller

$$S_1 = \frac{K_s \cdot (1 + K_d \cdot \theta_s)}{\theta_s \cdot (\mu_m - K_d) - 1} \qquad (2)$$

där

S_1 = koncentrationen substrat i utflödet (mg/l)

K_S = halvmättnadskonstant, den koncentration vid vilken $\mu = \mu_m/2$ (mg/l)

μ = specifik tillväxthastighet (d^{-1})

μ_m = maximivärde för $\mu_m(d^{-1})$

K_d = specifik sönderfallshastighet för aktiva fasta ämnen (d^{-1})

θ_S = slammets medelretentionstid, SRT (d)

Undersökning av denna ekvation leder till följande slutsatser:

i) Koncentrationen i utflödet är oberoende av koncentrationen i inflödet (S_0); således varierar den procentuella bionedbrytningen enligt koncentrationen i inflödet S_0.

ii) Den enda anläggningskontrollparameter som påverkar S_1 är slamretentionstiden θ_S.

iii) För en given koncentration i inflödet, S_0, finns det en kritisk slamretentionstid, dvs.

$$\frac{1}{\theta_{SC}} = \frac{\mu_s \cdot S_0}{K_s + S_0} - K_d \qquad (3)$$

där

θ_{SC} = kritisk slamretentionstid, under vilken de kompetenta mikroorganismerna sköljs ut ur anläggningen.

iv) Eftersom de övriga parametrarna i ekvation (2) är associerade med tillväxtkinetik, är det sannolikt att temperaturen påverkar utflödets substratnivå och den kritiska slamåldern, dvs. den slamretentionstid som behövs för att få en viss grad av rening ökar med sjunkande temperatur.

2. Utifrån en massbalans för fasta ämnen i Porous Pot-systemet och utifrån antagandet att koncentrationen fasta ämnen i anläggningens utflöde X_2 är lågt i jämförelse med luftningskärlets utflöde X_1, är slamretentionstiden

$$\theta_s = \frac{V \cdot X_1}{(Q_0 - Q_1) \cdot X_2 + Q_1 \cdot X_1} \qquad (4)$$

▼M4

och

$$\theta_s = \frac{V \cdot X_1}{Q_1 \cdot X_1} = \frac{V}{Q_1}$$

där

V = luftningskärlets volym (l)

X_1 = koncentrationen fasta ämnen i luftningskärlet (mg/l)

X_2 = koncentrationen fasta ämnen i utflödet (mg/l)

Q_0 = inflödets flödeshastighet (l/d)

Q_1 = avloppsslammets flödeshastighet (l/d)

Det är således möjligt att hålla slamretentionstiden på ett förhandsvalt värde genom att kontrollera avloppsslammets flödeshastighet Q_1.

Slutsatser:

3. Huvudsyftet med detta test är alltså att kunna förutse testkemikaliens koncentration i utflödet, och därmed testkemikaliens nivåer i vattenrecipienten.

4. Genom att plotta S_1 mot θ_S kan den kritiska slamretentionstiden θ_{SC} i vissa fall uppskattas på enkelt sätt, se t.ex. kurva 3 i figur 1. Om detta inte är möjligt kan θ_{SC} beräknas med ungefärliga värden på μ_m och K_S genom att plotta S_1 mot $S_1 \bullet \theta_S$.

Omordning av ekvation 1 ger följande:

$$\frac{S_1 \cdot \theta_s}{1 + \theta_s \cdot K_d} = \frac{K_s}{\mu_m} + \frac{S_1}{\mu_m} \quad (5)$$

Om K_d är lågt blir $1 + \theta_s \bullet K_d \sim 1$ och ekvation 5 blir enligt följande:

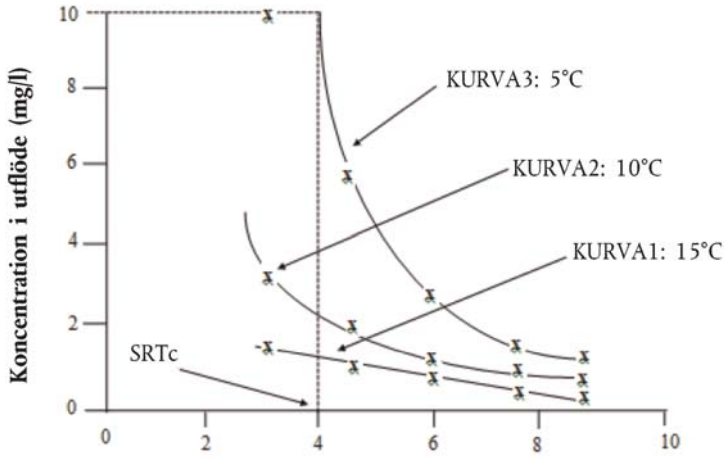
$$S_1 \cdot \theta_s = \frac{K_s}{\mu_m} + \frac{S_1}{\mu_m} \quad (6)$$

Då bör kurvan bli en rak linje (se figur 2) som har lutningen $1/\mu_m$ och skärningspunkt med K_S/μ_m; likaså är $\theta_S \sim 1/\mu_m$.

▼M4

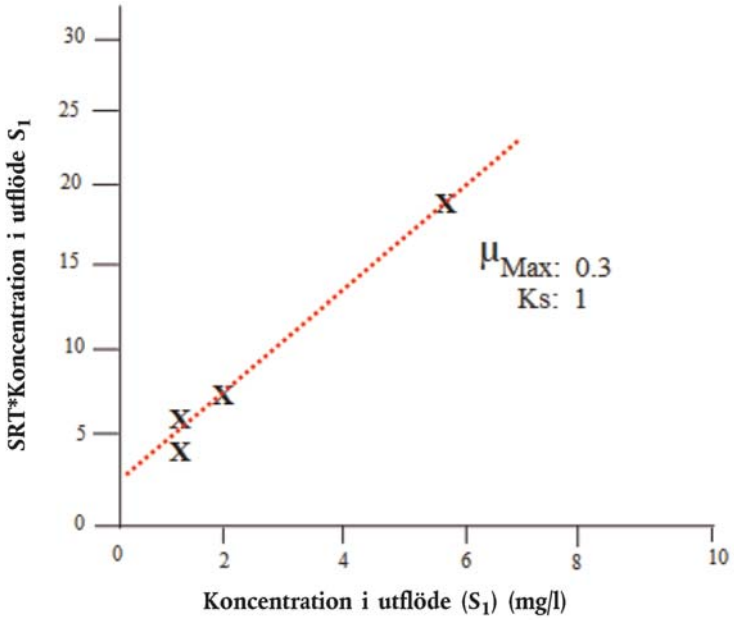
Figur 1

Tre temperaturer, fem SRT-värden



Figur 2

Regressionslinje SRT · S_1 mot S_1 vid T = 5 °C



Ordlista:

Koncentration i utflöde

Kurva

▼M4

Tillägg 7

TEST VID LÅGA (μg/l) KONCENTRATIONER

1. Kemikalierna i vattenmiljön förekommer ofta i mycket låga koncentrationer (μg/l), även i avloppsvatten. Vid sådana koncentrationer fungerar de sannolikt inte som primära substrat som resulterar i tillväxt, utan sönderfaller mer sannolikt som icke-växande sekundära substrat, parallellt med förekomsten av flera olika naturligt förekommande kolföreningar. Av det följer att sönderfallet av sådana kemikalier inte följer modellen som beskrivs i tillägg 6. Det finns flera modeller som kan tillämpas och under de betingelser som råder i system för rening av avloppsvatten kan flera modeller vara samtidigt aktiva. Det kommer att behövas en hel del mera forskning för att få klarhet i detta problem.

2. Fram till dess kan förfarandet som beskrivs i huvudtexten (kapitel C.10 A) följas, men endast för primär bionedbrytbarhet, med användning av lämpligt låga koncentrationer (< 100 μg/l) och ett validerat analysförfarande. Den procentuella bionedbrytningen kan beräknas (se punkt 54 i testmetoden) förutsatt att de abiotiska processerna (adsorption, flyktighet osv.) beaktas. Som exempel kan nämnas en studie gjord av Nyholm m.fl. (1) (2) med användning av en 4-timmarscykel i ett fill and draw-system. De rapporterade pseudo-första ordningens konstanter för 5 kemikalier som tillsatts till syntetiskt avloppsvatten i koncentrationer på 5–100 μg/l. För slutlig bionedbrytbarhet kan ^{14}C-märkta kemikalier användas. Beskrivning av detta går utöver räckvidden för denna testmetod eftersom det än så länge inte finns överenskomna förfaranden, om än en föreslagen metod för ISO 14592 (3) innehåller vägledning om användningen av ^{14}C-märkta kemikalier.

SCAS-test

3. Senare föreslogs ett enklare tvåstegstest (4) (5) (6) där SCAS-metoden (Semi Continous Activated Sludge) följs av ett kortvarigt kinetiskt test på prover tagna från SCAS-enheterna. SCAS-systemet körs med kända slamkasseringsgrader (till åtskillnad från den ursprungliga C.12-testmetoden) och matas med modifierat syntetiskt avloppsvatten eller avloppsvatten från hushåll. Det syntetiska avloppsvattnet modifierades (på grund av föränderligt pH-värde och slammets dåliga sedimentering) genom tillsats av fosfat som buffert, jästextrakt, järn(III)klorid och spårelementsalter, och COD höjdes till cirka 750 mg/l genom ökad koncentration av pepton och köttextrakt. Enheterna kördes med en 24-timmarscykel: luftning under 23 timmar, kassering av slam, sedimentering, borttagning av supernatant (utflöde) och därefter tillsats av syntetiskt avloppsvatten plus testkemikalie, upp till μg/l (dvs. ungefär samma koncentration som användes i korttidstestet). En gång i veckan ersattes 10 % av totalslammet med färskt slam för att upprätthålla balans i den mikrobiella populationen.

4. Koncentrationen av testkemikalie i början och i slutet av luftningen uppmäts och testet fortsätts tills en konstant eliminering av testkemikalie erhålls, vilket tar från en vecka till flera månader.

Korttidstest

5. Ett korttidstest (t.ex. 8 timmar) används för att bestämma (pseudo) första ordningens kinetiska konstant för sönderfall av testkemikalien i aktiverat slam med kända men olika ursprung och olika historia. Slamprover tas särskilt från SCAS-reaktorer – i slutet av luftningsperioden när koncentrationen organiskt substrat är låg – medan acklimatiseringsexperiment pågår (punkterna 3, 4). För jämförelse kan slam också tas från en parallell SCAS-enhet som inte

▼M4

exponeras för testkemikalie. Blandningar av slam och testkemikalie tillsatta i två eller flera koncentrationen i området 1–50μg/l luftas, utan tillsats av syntetiskt avloppsvatten eller annat organiskt substrat. Kvarvarande testkemikalie i lösningen bestäms med regelbundna mellanrum, t.ex. varje timme, beroende på kemikaliens sönderfallsegenskaper, under högst 24 timmar. Proverna centrifugeras före själva analysen.

Beräkningar

6. Data från SCAS-enheterna används för att beräkna procentandelen eliminerad testkemikalie (punkt 54). Likaså kan en konstant för genomsnittlig eliminering K_1 (normaliserad för koncentrationen suspenderade fasta ämnen) kalkyleras genom följande:

$$K_1 = 1/t \cdot \ln \frac{C_e}{C_i} \cdot 1/SS(1/g\ h)$$

där

t = luftningstiden (23 timmar)

C_e = koncentrationen vid luftningsperiodens slut (μg/l)

C_i = koncentrationen vid luftningsperiodens början (μg/l)

SS = koncentrationen av fasta ämnen i aktiverat slam (g/l)

7. För korttidstestet plottas logaritmen av procentuell återstående koncentration mot tiden och lutningen på den första delen (10–50 % sönderfall) av grafen motsvarar K_1, (pseudo)första ordningens konstant. Konstanten normaliseras med hänsyn till koncentrationen fasta ämnen i slammet genom att dividera lutningen med koncentrationen fasta ämnen i slammet. De rapporterade resultaten måste också innehålla uppgifter om initialkoncentrationen för testkemikalie och suspenderade fasta ämnen, slamretentionstiden, slammatning och slamkälla samt uppgifter om eventuell förhandsexponering för testkemikalien.

Resultatvariation

8. Variationen och andra aspekter rörande bionedbrytningens kinetik diskuterades nyligen vid en SETAC-workshop (7). Dessa studier bör, rapporterade och projekterade, ge en klarare uppfattning om den kinetik som fungerar i vattenreningsverk, och därmed en bättre tolkning av befintliga data och förslag till mer relevanta utformningar av nya testmetoder.

LITTERATUR

(1) Nyholm N., Jacobsen B. N., Pedersen B. M., Poulsen O, Dambourg A. och Schultz B. (1992), ”Removal of micropollutants in laboratory activated sludge reactors. Biodegradability”, *Wat. Res.* 26, s. 339–353.

(2) Jacobsen B.N., Nyholm N., Pedersen B.M., Poulsen O. och Ostfeldt P. (1993), ”Removal of organic micropollutants in laboratory activated sludge reactors under various operating conditions: Sorption”, *Wat. Res.* 27, s. 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 U. T., Pedersen J. P. och 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), s. 851–864.

(5) Berg U. T. och 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), s. 711–735.

(6) Danish Environmental Protection Agency 1996), ”Activated sludge biodegradability simulation test”, Environmental Project, No. 337, Nyholm, N. Berg, UT, Ingerslev, F. Miljö- och energiministeriet, Köpenhamn.

(7) ”Biodegradation kinetics: Generation and use of data for regulatory decision making (1997)”, Workshop at Port Sunlight, UK, Red. Hales S. G., Feitjel T., King H., Fox K. och Verstraete W., 4–6 september 1996, SETAC Europe, Bryssel.

▼M4

C.10-B: Biofilmer

INLEDNING

1. Simuleringstest används i regel på kemikalier som inte har klarat screeningtest för lätt bionedbrytbarhet (kapitel C.4 A till F i denna bilaga (9)) men som har klarat test för lätt bionedbrytbarhet. Undantagsvis används simuleringstest också för kemikalier där det krävs mer information, särskilt storvolymskemikalier, och i regel används test med aktiverat slam (C.10 A). Under vissa omständigheter krävs det dock specifik information om hur en kemikalie agerar när reningsmetoderna inbegriper biofilm (biologiska filter eller bakteriefilter, roterande biologiska kontaktorer, fluidbädd). För att möta dessa behov har olika slags utrustning tagits fram.

2. Gerike m.fl. (1) använde stora bakteriefilter i pilotskala enligt kopplad modell. Filtren var mycket utrymmeskrävande och krävde relativt stora mängder avloppsvatten eller syntetiskt avloppsvatten. Truesdale m.fl. (2) beskrev små filter (6 fot × 6 tum i diameter) som matades med naturligt avloppsvatten fritt från ytaktiva ämnen men som fortfarande krävde rätt stora volymer. Det krävs upp till 14 veckor för utveckling av en ”mogen” biofilm och ytterligare 4–8 veckor efter första tillförseln av det ytaktiva testämnet innan acklimatisering sker.

3. Baumann m.fl. (3) utvecklade ett betydligt mindre filter med polyesterfleece som först hade blötlagts i aktiverat slam såsom inert medium som underlag för biofilmen. Enda kolkälla var testkemikalien och bionedbrytbarheten bedömdes utifrån mätningar av upplöst organiskt kol (DOC) i inflöde och utflöde och utifrån mängden CO_2 i utloppsgasen.

4. Ett nytt sätt att närma sig frågan hade Gloyna m.fl. (4) som uppfann den roterande rörformiga reaktorn. På den inre ytan av ett roterande rör odlades en biofilm på känd ytareal genom passage av ett flöde som tillsattes i övre ändan av det svagt horisontellt lutande röret. Reaktorn har använts för att studera ytaktiva ämnens bionedbrytbarhet (5) samt för att undersöka biofilmens optimala tjocklek och diffusionen genom filmen (6). Gloyna m.fl. utvecklade reaktorn ytterligare, bl.a. genom att göra en modifikation som ger möjlighet att bestämma CO_2 i utloppsgasen.

5. Den roterande rörformiga reaktorn har antagits av Standing Committee of Analysts (UK) som en standardmetod för bedömning av både kemikaliers bionedbrytbarhet (7) och avloppsvattens behandlingsmöjlighet och toxicitet (8). Fördelarna med den metod som beskrivs här är att den är enkel, kompakt, reproducerbar och att det krävs relativt små volymer organiskt medium.

PRINCIP FÖR TESTMETODEN

6. Syntetiskt avloppsvatten eller avloppsvatten från hushåll, testkemikalien, i blandning eller för sig, appliceras på inre ytan av ett långsamt roterande lutande rör. Ett lager mikroorganismer, liknande dem som finns på biofiltermedia, byggs upp på den inre ytan. Reaktorns driftsbetingelser väljs så att man får adekvat eliminering av organiskt material och, om så krävs, oxidation av ammonium.

▼M4

7. Utflödet från röret samlas upp och får antingen sedimentera och/eller filtreras före analys av upplöst organiskt kol (DOC) och/eller testkemikalien med en specifik metod. Som jämförelse körs kontrollenheter som inte matas med testkemikalie parallellt under samma betingelser. Skillnaden mellan koncentrationerna DOC i utflödet från test- och kontrollenheterna antas bero på testkemikalien och dess organiska metaboliter. Skillnaden jämförs med koncentrationen tillsatt testkemikalie (som DOC) i syfte att kunna beräkna elimineringen av testkemikalien.

8. I regel kan bionedbrytning åtskiljas från bioadsorption genom detaljerad granskning av kurvan för eliminering mot tid. Bekräftelse fås vanligen genom ett test för lätt bionedbrytbarhet (syreupptagning eller koldioxidproduktion) där man använder ett acklimatiserat inokulat som tas i slutet av testet från de reaktorer som matas med testkemikalien.

INFORMATION OM TESTKEMIKALIEN

9. Testkemikaliens renhet, vattenlöslighet, flyktighet och adsorptionsegenskaper bör vara kända för att resultaten ska kunna tolkas korrekt.

10. I regel kan flyktiga och dåligt lösliga kemikalier inte testas om inte särskilda åtgärder vidtas (se tillägg 5 till kapitel C.10 A). Dessutom bör den kemiska strukturen eller minst den empiriska formeln vara känd för att kunna kalkylera teoretiska värden och/eller kontrollera uppmätta parametervärden, t.ex. teoretisk syreförbrukning (ThOD) och DOC.

11. Information om testkemikaliens toxicitet för mikroorganismer (se tillägg 4 till kapitel C.10 A) kan vara till hjälp för valet av lämpliga testkoncentrationer och kan även vara väsentlig för korrekt tolkning av låga värden för biologisk nedbrytbarhet.

GODKÄNNANDENIVÅER

12. Ursprungligen krävdes att den primära biologiska nedbrytningen av ytaktiva ämnen måste nå upp till minst 80 % för att kemikalien i fråga skulle få släppas ut på marknaden. Om 80 % eliminering inte uppnås, kan detta simuleringstest (bekräftande test) tillämpas, och det ytaktiva ämnet får endast släppas ut på marknaden förutsatt att mer än 90 % av kemikalien elimineras. Generellt gäller för kemikalier inte frågan om godkänt/ej godkänt, och värdet på den procentuella eliminering som erhållits kan användas i uppskattningsberäkningar av den sannolika miljökoncentration som kan användas vid farobedömning för kemikalier. I ett antal studier av rena kemikalier konstaterades att elimineringsprocenten för DOC var > 90 % i tre fjärdedelar av fallen och > 80 % i över 90 % av fallen för kemikalier som visade betydande grad av biologisk nedbrytbarhet.

REFERENSKEMIKALIER

13. För att säkerställa att försöksförfarandet genomförs korrekt är det lämpligt att med vissa mellanrum testa referenskemikalier med känt beteende. Sådana kemikalier är adipinsyra, 2-fenylfenol, 1-naftol, 2,2'-bifenyldikarboxylsyra och 1-naftoesyra.

TESTRESULTATENS REPRODUCERBARHET

14. Den relativa standardavvikelsen inom tester konstaterades i ett laboratorium i Storbritannien vara 3,5 % medan avvikelsen mellan test var 5 % (7).

▼M4

METODBESKRIVNING

Apparatur

Roterande rörformiga reaktorer

15. Apparaturen (se figur 1 och 2 i tillägg 8) består av en grupp akrylrör med en längd på 30,5 cm och innerdiameter på 5 cm per rör, stödda på hjul med hjulring av gummi inom en stödram av metall. Varje rör har på utsidan en läpp med ett djup på cirka 0,5 cm för att hålla röret på hjulen, innerytan är uppruggad med grov stålull och det finns en inre läpp med 0,5 cm djup vid övre ändan (inmatningsändan) för att hålla kvar vätskan. Rören har en horisontell lutning på cirka en grad för att få önskad kontakttid när testmediet appliceras i ett rent rör. De gummiklädda hjulens rotation drivs med en långsam motor med variabel hastighet. Rörets temperatur kontrolleras genom att det hålls i ett utrymme med konstant temperatur.

16. Genom att innesluta varje rörreaktor i ett aningen större rör med lock och säkerställa att anslutningarna är gastäta, kan utgående CO_2-gas samlas upp i en alkalisk lösning för efterföljande mätning (6).

17. För 24-timmarsmatning till varje teströr av organiskt medium med tillsatt testkemikalie, om tillämpligt, hålls mediet i ett 20-literskärl (A) (se figur 2). Om så krävs kan testkemikalielösningen doseras separat. Nära botten av varje lagringskärl finns ett utlopp som är kopplat med lämpliga rör, t.ex. av silikongummi, via en peristaltisk pump (B) till ett glas- eller akrylmatningsrör som går 2–4 cm in i den högre (inmatnings)ändan av det lutade röret (C). Utflödet får droppa ut från det lutade rörets lägre ända för uppsamling i ett annat lagringskärl (D). Utflödet sedimenteras eller filtreras före analys.

Filtreringsapparatur, centrifug

18. Utrustning för filtrering av prover med membranfilter av lämplig porstorlek (nominell öppningsdiameter 0,45 μm) som adsorberar organiska kemikalier eller har minimalt utsläpp av organiskt kol. Om filter som släpper ut organiskt kol används, tvätta filtren försiktigt med hett vatten för att avlägsna detta kol. Alternativt kan man använda en centrifug som når upp till 40 000 m/s^2.

19. Analytisk utrustning för bestämning av

— DOC/totalt organiskt kol (TOC) eller kemisk syreförbrukning (COD),

— specifik kemikalie (HPLC, GC osv.), om så krävs,

— pH, temperatur, surhet, alkalinitet,

— ammonium, nitrit och nitrat, om testerna genomförs under nitrifikationsförhållanden.

Vatten

20. Kranvatten med mindre än 3 mg/l DOC.

21. Destillerat eller avjoniserat vatten med mindre än 2 mg/l DOC.

▼M4

Organiskt medium

22. Syntetiskt avloppsvatten, avloppsvatten från hushåll eller en blandning av båda kan användas som organiskt medium. Det har visat sig att användning av enbart avloppsvatten från hushåll ofta ger ökad procentandel DOC-eliminering (i enheter för aktiverat slam) och t.o.m. möjliggör biologisk nedbrytning av vissa kemikalier som inte bryts ned när syntetiskt avloppsvatten enligt OECD används. Därför rekommenderas användning av avloppsvatten från hushåll. Mät DOC- eller COD-koncentrationen i varje ny sats av organiskt medium. Det organiska mediets surhet eller alkalinitet ska vara känd. Om mediet har låg surhet eller alkalinitet kan det krävas tillsats av lämplig buffert (natriumvätekarbonat eller kaliumvätefosfat) för att pH i reaktorn ska hållas kring 7,5 ± 0,5 under testet. Mängden buffert och tillsättningstidpunkten måste fastställas separat i varje enskilt fall.

Syntetiskt slam

23. Per liter kranvatten upplöses följande: 160 mg pepton, 110 mg köttextrakt, 30 mg urea, 28 mg vattenfritt dikaliumvätefosfat (K_2HPO_4), 7 mg natriumklorid (NaCl), 4 mg kalciumkloriddihydrat ($CaCl_2{\cdot}2H_2O$), och 2 mg magnesiumsulfatheptahydrat ($Mg_4SO_2{\cdot}7H_2O$). Detta syntetiska avloppsvatten enligt OECD är ett exempel, och ger en medelkoncentration på cirka 100 mg/l DOC i inflödet. Alternativt kan man använda andra sammansättningar med ungefär samma DOC-koncentration, som ligger närmare verkligt avloppsvatten. Detta syntetiska avloppsvatten kan göras i destillerat vatten i en koncentrerad form och förvaras i cirka 1 C upp till en vecka. Späd vid behov ut med kranvatten (detta medium är inte tillfredsställande, kvävekoncentrationen är t.ex. mycket hög och kolhalten relativt låg, men det finns inga bättre förslag utom att tillsätta mera fosfat som buffert samt extra pepton).

Avloppsvatten från hushåll

24. Använd färsk bottensats av avloppsvatten som samlas upp dagligen från reningsanläggningar som i huvudsak tar emot avloppsvatten från hushåll. Avloppsvattnet ska samlas upp från primärsedimenteringstankens överflödeskanal eller från matningen till aktivslamanläggningen, och det ska till övervägande del vara fritt från grova partiklar. Avloppsvattnet kan användas efter ett antal dagars lagring vid cirka 4 °C, om det går att påvisa att DOC (eller COD) inte har sjunkit betydligt (mindre än 20 %) under lagringen. För att undvika systemstörningar ska DOC (eller COD) i varje ny sats justeras före användningen till ett lämpligt konstant värde, t.ex. genom utspädning med kranvatten.

Smörjmedel

25. Glycerol eller olivolja kan användas för smörjning av den peristaltiska pumpens rullar; båda är lämpliga för användning på silikongummirör.

Stamlösningar av testkemikalien

26. För kemikalier med rimlig löslighet bereds stamlösningar med lämpliga koncentrationer (t.ex. 1–5 g/l) i avjoniserat vatten eller i mineraldelen av syntetiskt avloppsvatten. För olösliga kemikalier, se tillägg 5 till kapitel C.10 A. Denna metod är inte lämplig för flyktiga kemikalier utan modifiering av de rörformade reaktorerna (punkt 16). Bestäm DOC och TOC för stamlösningen och upprepa mätningarna för varje ny sats. Om skillnaden mellan DOC och TOC är större än 20 % bör testkemikaliens vattenlöslighet kontrolleras. Jämför testkemikaliens DOC eller koncentration uppmätt genom specifik analys

▼M4

av stamlösningen med det nominella värdet, för att kunna bedöma om utbytet är tillräckligt bra (i regel kan > 90 % förväntas). Särskilt för dispersioner bör man försäkra sig om att DOC kan användas som analytisk parameter; annars måste en analysteknik som är specifik för testkemikalien användas. För dispersioner krävs centrifugering av proverna. För varje ny sats bör mätning göras av DOC, COD eller testkemikalien med specifik analys.

27. Bestäm stamlösningens pH. Extremvärden tyder på att tillsats av kemikalien kan påverka pH-värdet för det aktiverade slammet i testsystemet. I så fall bör stamlösningen neutraliseras till pH 7 ± 0,5 med små mängder oorganisk syra eller bas, men utfällning av testkemikalien bör undvikas.

FÖRFARANDE

Förberedning av organiskt medium för dosering

28. Se till att alla inflödes- och utflödesbehållare samt rören från inflödeskärl och till utflödeskärl rengörs omsorgsfullt för att eliminera mikrobtillväxt initialt och under hela testet.

29. Förbered färskt syntetiskt avloppsvatten (punkt 23) varje dag, antingen från fasta ämnen eller från koncentrerad stamlösning genom lämplig utspädning med kranvatten. Mät upp den mängd som krävs i en cylinder och fyll på i ett rent inflödeskärl. Tillför vid behov också nödvändig mängd stamlösning av testkemikalie eller referenskemikalie till det syntetiska avloppsvattnet före utspädning. Om det är mera praktiskt eller nödvändigt för att undvika förlust av testkemikalien, förbered en separat utspädd lösning av testkemikalien i ett separat kärl och mata lösningen till de lutade rören via en skild doseringspump.

30. Alternativt (och helst) bör sedimenterat avloppsvatten från hushåll användas (punkt 24) som uppsamlats färskt varje dag, om möjligt.

Användning av de roterande rörformade reaktorerna

31. Två identiska rörformade reaktorer behövs för bedömning av en testkemikalie, och de monteras i ett utrymme med konstant temperatur, i regel 22 ± 2 °C.

32. Justera de peristaltiska pumparna på 250 ± 25 ml/tim organiskt medium (utan testkemikalie) till de lutade rören, som ska ha en rotation på 18 ± 2 rpm. Tillsätt smörjmedel (punkt 25) på pumpens rör (till en början och därefter regelbundet under testets gång) för att säkerställa korrekt funktion och förlänga rörens livslängd.

33. Justera rörens horisontella lutningsvinkel så att en uppehållstid på 125 ± 12,5 sekunder fås vid matning in i ett rent rör. Uppskatta retentionstiden genom att tillsätta en icke-biologisk markör (t.ex. NaCl, inert färgmedel) till matningen – den tid som krävs för att nå toppkoncentration i utflödet anses utgöra den genomsnittliga retentionstiden (när filmen är maximal kan retentionstiden öka till cirka 30 minuter).

34. Dessa parametrar har konstaterats ge adekvat eliminering (> 80 %) av DOC (eller COD) och producera nitrifierade utflöden. Flödeshastigheten bör ändras om elimineringen är otillräcklig eller om simuleringen gäller ett specifikt reningsverk. I det senare fallet bör doseringen av det organiska mediet justeras tills reaktorns prestanda är samma som för reningsverket.

▼M4

Inokulering

35. Luftburen inokulering kan räcka för att starta tillväxt av mikroorganismer när syntetiskt avloppsvatten används; om så inte sker, tillsätt 1 ml/l sedimenterat avloppsvatten till matningen under 3 dagar.

Mätningar

36. Kontrollera regelbundet att doseringen och roteringshastigheterna ligger inom satta gränser. Mät också utflödets pH, särskilt om nitrifikation förväntas.

Provtagning och analys

37. Metod, mönster och frekvens väljs enligt testets ändamål. Ta t.ex. stickprov av inflöde och utflöde eller ta prover över en längre period, t.ex. 3–6 veckor. Under den första perioden, utan testkemikalie, tas prover två gånger i veckan. Filtrera proverna genom membraner eller centrifugera dem vid cirka 40 000 m/s^2 i cirka 15 minuter (punkt 18). Det kan vara nödvändigt att sedimentera och/eller grovfiltrera proverna före membranfiltrering. Bestäm DOC (eller COD) minst i duplikat och om så krävs BOD, ammonium och nitrit/nitrat.

38. Alla analyser bör göras så snart som möjligt efter provtagning och beredning av proverna. Om analyser måste senareläggas bör proverna förvaras vid cirka 4 C i mörker i helt fyllda och tätt förslutna flaskor. Om proverna måste förvaras längre än 48 timmar bör de konserveras genom djupfrysning, syrabehandling eller genom tillsats av lämpligt gift (t.ex. 20 ml/l av en 10 g/l-lösning av kvicksilver(II) klorid). Se till att konserveringstekniken inte påverkar analysresultaten.

Inkörningsperiod

39. Under inkörningsperioden växer ytans biofilm till optimal tjocklek, vilket i regel tar cirka 2 veckor men inte får överskrida 6 veckor. Elimineringen (punkt 44) av DOC (eller COD) ökar och når platåvärde. När platåvärdet har nått samma nivå i båda rören, väljs ena röret till kontrollrör för återstoden av testet, under vilken rören bör fungera på ett enhetligt sätt.

Tillsättning av testkemikalie

40. I detta skede tillsätts testkemikalie till den andra reaktorn i lämplig koncentration, i regel 10–20 mg C/l. Kontrollreaktorn matas fortsättningsvis endast med organiskt medium.

Acklimatiseringsperiod

41. Fortsätt med analyserna av DOC (eller COD) två gånger i veckan och om även primär bionedbrytbarhet ska bedömas, ska även en mätning av testkemikaliens koncentration göras genom specifik analys. Låt acklimatiseringen pågå i 1–6 veckor (eller under speciella omständigheter längre) efter att testkemikalien tillsatts för första gången. När den procentuella elimineringen (punkterna 43–45) når ett maximivärde bestäms 12–15 giltiga värden från platåfasen över cirka 3 veckor för utvärdering av genomsnittlig procentuell eliminering. Testet anses vara slutfört när en tillräckligt hög grad av eliminering nås. Normalt ska testet inte pågå längre än 12 veckor från första tillsättning av testkemikalien.

▼M4

Ömsning av film

42. Plötsligt avlägsnande av stora mängder överskottsfilm från rören (”ömsning”), sker med relativt regelbundna intervall. För att säkerställa att resultatens jämförbarhet inte påverkas bör testet täcka minst två fulla cykler av tillväxt och ömsning.

DATA OCH RAPPORTERING

Behandling av resultaten

43. Beräkna procentandelen DOC- eller COD-eliminering av testkemikalie för varje bedömningstidpunkt genom följande ekvation:

$$D_t = 100\ [C_s - (E - E_o)]/C_s\%$$

där

D_t = procentuell eliminering av DOC (eller COD) vid tidpunkten t,

C_s = koncentrationen DOC (eller COD) som kan tillskrivas testkemikalien, helst uppskattad utifrån stamlösningens koncentration och tillsatt volym (mg/l),

E = uppmätt DOC (eller COD) i testutflödet vid tidpunkten t (mg/l),

E_o = uppmätt DOC (eller COD) i kontrollutflödet vid tidpunkten t (mg/l).

Upprepa beräkningen för referenskemikalien, om sådan testas.

Kontrollreaktorns funktion

44. Graden av DOC- eller COD-eliminering (D_B) i det organiska mediet i kontrollenheten bidrar till bedömningen av den biologiska nedbrytningsaktiviteten i biofilmen under testet. Den procentuella elimineringen kan beräknas genom följande ekvation:

$$D_B = 100\ (1 - E_o/C_m)\ \%$$

där

C_m = DOC (eller COD) i det organiska mediet i kontrollenhetens inflöde (mg/l).

45. Elimineringen av testkemikalie (D_{ST}) kan beräknas om den har uppmätts med en specifik analysmetod vid varje bedömningstidpunkt, genom följande ekvation:

$$DST = 100\ (1 - S_e/S_i)\ \%$$

där

S_i = uppmätt eller helst uppskattad koncentration av testkemikalien i testinflödet (mg/l),

S_e = uppmätt koncentration av testkemikalien i testutflödet vid tidpunkten t (mg/l).

▼M4

Om den analytiska metoden ger ett positivt värde i oförändrat avloppsvatten ekvivalent med S_c mg/l, kan den procentuella elimineringen (D_{SC}) beräknas genom följande:

$$DSC = 100\ (S_i - S_e + S_c)/(S_i + S_c)\ \%$$

Presentation av testresultat

46. Plotta den procentuella elimineringen D_t och D_{ST} (eller D_{SC}), om tillgänglig, mot tiden (se tillägg 2 till kapitel C.10 A). Beräkna medelvärdet (uttryckt i nästa heltal) och standardavvikelsen för de 12–15 värden för D_T (och D_{ST} om tillgängligt) som erhållits för platåfasen, som procentandelen eliminering av testkemikalien. Elimineringskurvans form kan ge underlag för vissa slutsatser om elimineringsprocessen.

Adsorption

47. Om kraftig DOC-eliminering observeras från början av testet, är det sannolikt att testkemikalien elimineras genom adsorption på biofilmen. Detta kan eventuellt påvisas genom att bestämma mängden testkemikalie som adsorberas på fasta ämnen som lossnat från filmen. Det är inte vanligt att elimineringen av DOC för adsorberbara kemikalier förblir kraftig genom hela testet; eliminering är i regel kraftig i början för att sedan gradvis minska till ett jämviktsvärde. Om däremot den adsorberade testkemikalien på ett eller annat sätt kan orsaka acklimatisering av den mikrobiella populationen, stiger testkemikaliens DOC-eliminering därefter och når ett högt platåvärde.

Lagfas

48. På samma sätt som vid statiska screeningtest, kräver många testkemikalier en lagfas innan full biologisk nedbrytning inträffar. Under lagfasen sker acklimatisering eller anpassning av de kompetenta bakterierna praktiskt taget utan eliminering av testkemikalien vid bakterietillväxtens inledande skede. Denna fas upphör och nedbrytningsfasen anses börja när cirka 10 % av den inledande mängden testkemikalie har eliminerats (efter att adsorption har fått ske, i förekommande fall). Lagfasen är ofta mycket varierande och svår att reproducera.

Platåfas

49. Platåfasen i en elimineringskurva för ett kontinuerligt test definieras som den fas då maximal nedbrytning sker. Platåfasen bör pågå minst 3 veckor och ska ge cirka 12–15 uppmätta giltiga värden.

Genomsnittlig elimineringsgrad för testkemikalien

50. Beräkna medelvärdet utifrån testkemikaliens elimineringsvärden D_t (och D_{st}) under platåfasen. Avrundat till närmaste heltal (i %) är detta testkemikaliens elimineringsgrad. Dessutom rekommenderas en beräkning av medelvärdets 95 % konfidensintervall. Beräkna på samma sätt genomsnittlig eliminering (D_B) av det organiska mediet i kontrollkärlet.

▼M4

Indikation på biologisk nedbrytning

51. Om testkemikalien inte adsorberas i betydlig grad på biofilmen och elimineringskurvan har den typiska formen för en biologisk nedbrytningskurva med lagfas, kan nedbrytnings- och platåfaserna (punkterna 48, 49) med säkerhet tillskrivas biologisk nedbrytning. Om det har förekommit stark inledande eliminering kan simulationstestet inte användas för att skilja mellan biologiska och abiotiska elimineringsprocesser. I sådana fall, och i andra fall där det kan finnas tvivel om biologisk nedbrytning (t.ex. vid strippning), bör en analys göras rörande adsorberad testkemikalie eller ytterligare (screening)test för biologisk nedbrytning genomföras på grundval av parametrar som klart indikerar biologiska processer. Sådana test är syreupptagningsmetoder (kapitel C.4 i denna bilaga D, E och F (9)) eller test med mätning av koldioxidproduktion (kapitel C.4 C i denna bilaga) eller Headspace-metoden (10); som inokulat används förhandsexponerad biofilm från lämplig reaktor.

52. Om både DOC-eliminering och eliminering av specifik kemikalie har uppmätts och det finns betydande skillnader mellan elimineringsgraderna (DOC-elimineringen är lägre), tyder detta på att utflödena innehåller intermediära organiska produkter som kan vara svårare att bryta ned och som måste undersökas.

Testresultatens giltighet

53. Testet kan anses vara giltigt om graden av DOC- eller COD-eliminering (D_B) i kontrollenheten är > 80 % efter 2 veckor och inget ovanligt har observerats.

54. Om en lätt biologiskt nedbrytbar (referens)kemikalie har testats, bör graden av biologisk nedbrytbarhet vara > 90 % och skillnaden mellan duplikatvärden får inte vara större än 5 %. Om dessa två kriterier inte uppfylls bör försöksförfarandena ses över och/eller avloppsvatten från hushåll tas från en annan källa.

55. Likaså gäller att skillnader mellan bionedbrytningsvärden från duplikatenheter (om sådana används) för behandling av testkemikalie inte får avvika med mer än 5 %. Om detta kriterium inte uppfylls men elimineringen är stark, bör analysen fortsätta i ytterligare tre veckor. Om elimineringen är svag bör testkemikaliens inhiberande effekter undersökas, om de inte är kända, och testet upprepas med en lägre koncentration testkemikalie, om detta är genomförbart.

Testrapport

56. Testrapporten ska innehålla följande information:

Testkemikalie:

— Identifieringsdata.

— Fysikalisk natur och, när det är relevant, fysikalkemiska egenskaper.

Testbetingelser:

— Eventuella modifieringar av testsystemet, särskilt vid testning av olösliga eller flyktiga kemikalier.

— Typ av organiskt medium.

— Andel och egenskaper hos industriellt avfall i avloppsvattnet, om sådant ingår, och om kända.

— Inokuleringsmetod.

▼M4

— Stamlösningens DOC (upplöst organiskt kol) och TOC (totalt organiskt kol), i förekommande fall beredningssätt för suspension, använda testkoncentrationer, motivering för koncentrationer utanför intervallet 10–20 mg/l DOC, tillsättningsmetod, datum för första tillsättning, eventuella koncentrationsändringar.

— Genomsnittlig hydraulisk retentionstid (utan tillväxt), rörets rotationshastighet, ungefärlig lutningsvinkel, om möjligt.

— Uppgifter om lossning (ömsning), tid och intensitet.

— Testtemperatur och temperaturområde.

— Analystekniker som använts.

Testresultat:

— Alla uppmätta data (DOC, COD), specifika analyser, pH, temperatur, kvävekemikalier, om relevant.

— Alla beräknade värden för D_t (eller D_{tc}), D_B och D_{St} i tabellform samt elimineringskurvor.

— Information om lag- och platåfaserna, testets tidslängd, elimineringsgrad för testkemikalien och referenskemikalien (om testad) och för det organiska mediet (i kontrollenheten), tillsammans med statistiska data och utlåtanden om biologisk nedbrytbarhet och testets giltighet.

— Diskussion om resultaten.

LITTERATUR

(1) Gerike P., Fischer W., Holtmann W. (1980), ”Biodegradability determinations in trickling filter units compared with the OECD Confirmatory Test”, *Wat. Res.* 14, s. 753–758.

(2) Truesdale G. A., Jones K., Vandyke K. G. (1959), ”Removal of synthetic detergents in sewage treatment processes: Trials of a new biologically attackable material”, *Wat. Waste Tr. J.* 7, s. 441–444.

(3) Baumann U., Kuhn G. och Benz M. (1998), ”Einfache Versuchsanordnung zur Gewinnung gewässerökologisch relevanter Daten”, *UWSF - Z. Umweltchem. Ökotox*, 10, s. 214–220.

(4) Gloyna E. F., Comstock R. F., Renn C. E. (1952), ”Rotary tubes as experimental trickling filters”, *Sewage ind. Waste* 24, s. 1355–1357.

(5) Kumke G. W., Renn C.E. (1966), ”LAS removal across an institutional trickling filter”, *JAOCS* 43, s. 92–94.

(6) Tomlinson T. G., Snaddon D. H. M., (1966), ”Biological oxidation of sewage by films of micro-organisms”, *Int.J. Air Wat. Pollut.* 10, s. 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 denna bilaga, Bestämning av ”lätt” bionedbrytbarhet A–F.

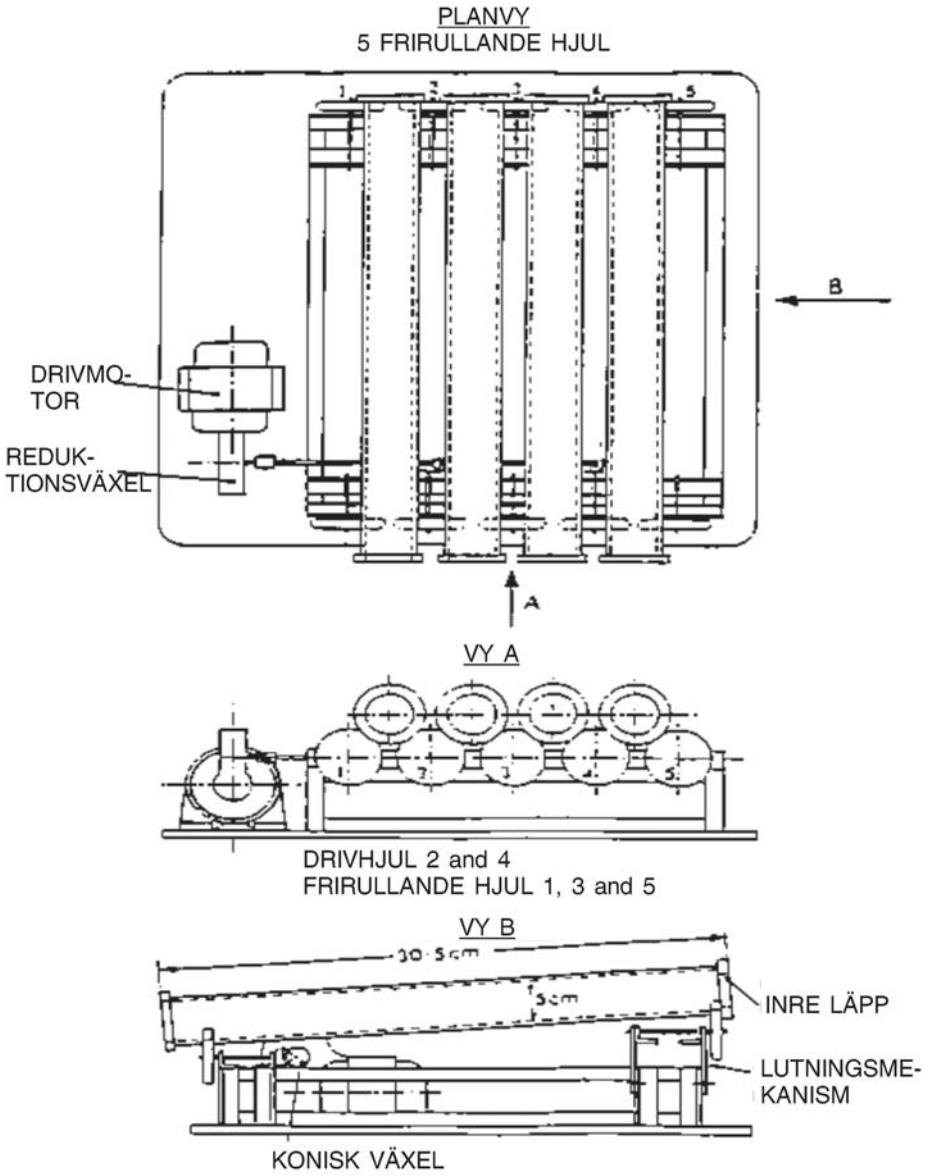
(10) ISO 14593 (1998), *Water Quality - Evaluation in an aqueous medium of the ultimate biodegradability of organic compounds. Method by the analysis of inorganic carbon in sealed vessels*.

▼**M4**

Tillägg 8

Figur 1

Roterande rör



Ordlista:

Planvy

Vy A/B

Drivhjul

Frirullande hjul

Drivmotor

Reduktionsväxel

Inre läpp

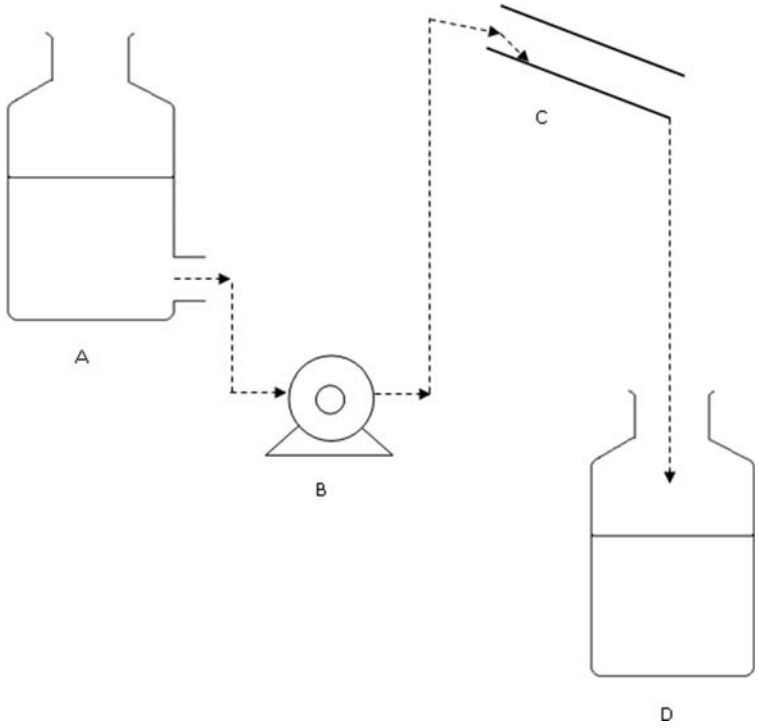
Lutningsmekanism

Konisk växel

▼**M4**

Figur 2

Flödesschema



A: Matningskärl

B: Peristaltisk pump

C: Roterande rör

D: Uppsamlingskärl för utflöde

DEFINITIONER

testkemikalie: alla ämnen eller blandningar som testas med denna testmetod.

kemikalier: termen kemikalie används i vid bemärkelse i Unced-avtal (Unced, United Nations Conference on the Environment and Development, dvs. Förenta nationernas konferens om miljö och utveckling) och i dokument som grundar sig på dessa, och termen omfattar ämnen, produkter, blandningar, beredningar eller motsvarande som kan användas i befintliga system.

▼M6

C.11 RESPIRATIONSHÄMNINGSTEST FÖR AKTIVERAT SLAM (KOL- OCH AMMONIUMOXIDATION)

INLEDNING

1. Denna testmetod motsvarar OECD:s testriktlinje (TG) 209 (2010). Genom denna testmetod kan man bestämma effekterna av en kemikalie på mikroorganismer (främst bakterier) från aktiverat slam, genom att man mäter deras respirationshastighet (kol- och/eller ammoniumoxidation) under definierade förhållanden vid olika koncentrationer av testkemikalien. Testmetoden bygger på ETAD:s (Ecological and Toxicological Association of the Dyestuffs Manufacturing Industry) test (1) (2), på den tidigare OECD-testriktlinjen TG 209 (3) och på den reviderade ISO-standarden 8192 (4). Testets syfte är att tillhandahålla en snabb screeningmetod för bedömning av kemikaliers effekter på mikroorganismerna i sådant aktivt slam som används för biologisk (aerob) nedbrytning i avloppsreningsverk. Testresultaten kan även fungera som en indikator på lämpliga icke-hämmande koncentrationer för testkemikalier som ska användas i tester av bionedbrytbarhet (t.ex. kapitlen C.4 A–F, C.9, C.10, C.12 och C.29 i denna bilaga samt OECD:s testriktlinje 302C). I detta fall kan testet utföras som ett screeningtest, liknande ett preliminärt test eller ett toleranstest (se punkt 39), som endast beaktar den totala respirationen. Denna information bör dock användas med försiktighet när det gäller tester av lätt bionedbrytbarhet (kapitlen C.4 A–F och C.29 i denna bilaga) i vilka inokulatkoncentrationen är betydligt lägre än den som används i denna testmetod. Frånvaro av hämning i detta respirationstest innebär inte automatiskt icke-hämmande förhållanden i testerna av lätt bionedbrytbarhet i kapitel C.4 A–F eller C.29 i denna bilaga.

2. I allmänhet verkar respirationshämningstestet ha tillämpats framgångsrikt ända sedan det först offentliggjordes, men i vissa fall har felaktiga resultat rapporterats, t.ex. (2) (4) (5). Koncentrationsrelaterade respirationskurvor blir ibland bifasiska, dos-responsplottar har förvanskats och EC_{50}-värden har varit oväntat låga (5). Undersökningar har visat att sådana resultat uppstår när det aktiverade slam som används i testet genomgår betydande nitrifikation och testkemikalien har avsevärt större inverkan på oxidationen av ammonium än på den allmänna heterotrofa oxidationen. Man kan därför få bukt med dessa felaktiga resultat genom att utföra ytterligare tester med en särskild nitrifikationshämmare. Genom att mäta syreupptagningshastigheten både i närvaro och frånvaro av en sådan hämmare, t.ex. N-allyltiourea (ATU), kan man beräkna de separata totala syreupptagningshastigheterna för heterotrof oxidation och nitrifikation (4) (7) (8). De hämmande effekterna av en testkemikalie på dessa två processer kan fastställas och EC_{50}-värden för både heterotrof oxidation av organiskt kol och ammoniumoxidation (nitrifikation) kan beräknas på vanligt sätt. Det bör noteras att den hämmande inverkan av N-allyltiourea i vissa sällsynta fall helt eller delvis kan upphävas genom komplexbildning med testkemikalier eller tillsatser till testmediet, t.ex. Cu^{++}-joner (6). Cu^{++}-joner är essentiella för *Nitrosomonas*, men giftiga i högre koncentrationer.

3. Behovet av nitrifikation i den aeroba reningen av avloppsvatten, ett nödvändigt steg i processen för att avlägsna kväve från avloppsvattnet genom denitrifikation till gasformiga produkter, har blivit mycket akut, särskilt i europeiska länder. EU har nu fastställt lägre gränsvärden för kvävekoncentrationen i behandlat avloppsvatten som släpps ut i mottagande vattenmassor ([1]).

([1]) Rådets direktiv 91/271/EEG av den 21 maj 1991 om rening av avloppsvatten från tätbebyggelse. EGT L 135, 30.5.1991, s. 40.

▼M6

4. För de flesta ändamål är det lämpligt att bara använda den metod som gäller effekter på oxidationen av organiskt kol. I vissa fall kan det dock krävas en undersökning av effekterna enbart på nitrifikationen, eller på både nitrifikationen och oxidationen av organiskt kol, fast var för sig, för att man ska kunna tolka resultaten och förstå effekterna.

PRINCIP FÖR TESTMETODEN

5. Respirationshastigheterna i proven med aktiverat slam till vilka syntetiskt avloppsvatten tillförts mäts i en sluten cell med en syreelektrod efter en kontakttid på 3 timmar. Om exponeringsscenariot ska vara realistiskt kan det vara lämpligt med längre kontakttider. Om testkemikalien snabbt bryts ned, t.ex. abiotiskt genom hydrolys, eller är instabil och koncentrationen inte kan upprätthållas tillräckligt väl, kan även en kortare exponeringstid, t.ex. 30 minuter, användas. Känsligheten i varje parti aktiverat slam bör kontrolleras med en lämplig referenskemikalie på exponeringsdagen. Testet används vanligtvis för att bestämma EC_x-värden (t.ex. EC_{50}) för testkemikalien och/eller NOEC-värdet.

6. Hämningen av syreupptagningen för mikroorganismer som oxiderar organiskt kol kan uttryckas separat från hämningen för mikroorganismer som oxiderar ammonium genom mätning av syreförbrukningshastigheten med och utan tillsats av n-allyltiourea, ett ämne som specifikt hämmar oxidationen av ammonium till nitrit hos de bakterier som utför första steget i nitrifikationen. I detta fall beräknas den procentuella hämningen av syreupptagningshastigheten genom en jämförelse av syreupptagningen i närvaro av testkemikalien med ett medelvärde för syreupptagningen i motsvarande kontrollprover utan testkemikalie, både i närvaro och frånvaro av n-allyltiourea.

7. Eventuell syreupptagning till följd av abiotiska processer kan påvisas genom en bestämning av hastigheten i blandningar bestående av testkemikalie, syntetiskt avloppsvattensmedium och vatten, i vilka aktiverat slam utelämnats.

INFORMATION OM TESTKEMIKALIEN

8. Testkemikaliens identifiering (helst CAS-nummer), namn (IUPAC), renhetsgrad, vattenlöslighet, ångtryck, flyktighet och adsorptionsegenskaper bör vara kända för att möjliggöra en korrekt tolkning av resultaten. I regel kan flyktiga kemikalier inte testas på lämpligt sätt om inte särskilda åtgärder vidtas (se punkt 21).

TESTMETODENS TILLÄMPBARHET

9. Testmetoden kan tillämpas på vattenlösliga, svårlösliga och flyktiga kemikalier. Det är dock inte alltid möjligt att få fram EC_{50}-värden med kemikalier som har begränsad löslighet, och giltiga resultat med flyktiga kemikalier kan endast uppnås om merparten (till exempel > 80 %) av testkemikalien återstår i reaktionsblandningen i slutet av exponeringsperioden eller -perioderna. Uppgifter som utgör ytterligare analytiskt stöd bör lämnas in så att bestämningen av EC_x-koncentrationen kan förbättras om man är osäker på testkemikaliens stabilitet eller flyktighet.

▼M6

REFERENSKEMIKALIER

10. Referenskemikalier bör regelbundet testas för att säkerställa att testmetoden och testbetingelserna är tillförlitliga, och för att på exponeringsdagen kontrollera känsligheten hos varje parti aktiverat slam som används som mikrobiellt inokulat. Kemikalien 3,5-diklorfenol (3,5-DCP) är lämplig att använda som referensinhibitorsubstans, eftersom man vet att den hämmar respirationen och används i många olika typer av tillväxthämnings- och toxicitetstester (4). Även koppar(II)sulfatpentahydrat kan användas som referensämne för hämning av den totala respirationen (9). N-metylanilin kan användas som särskild referensinhibitorsubstans för nitrifikation (4).

KRITERIER FÖR TESTRESULTATENS GILTIGHET OCH REPRODUCERBARHET

11. Blankproven (utan testkemikalie eller referenskemikalie) bör inte ha en syreupptagningshastighet som är mindre än 20 mg syre per gram aktiverat slam (torrvikt suspenderade fasta ämnen) per timme. Om hastigheten är lägre bör testet upprepas med tvättat aktiverat slam eller med slam från en annan källa. Variationskoefficienten för syreupptagningshastigheten i kontrollreplikaten bör inte vara mer än 30 % i slutet av det definitiva testet.

12. I ett internationellt ringtest från 2004 som organiserades av ISO (4) och där man använde aktiverat slam från avloppsvatten från hushåll, befanns EC_{50} för 3,5-DCP ligga i intervallet 2–25 mg/l för den totala respirationen, 5–40 mg/l för den heterotrofa respirationen och 0,1–10 mg/l för respirationen vid nitrifikation. Om EC_{50} för 3,5-DCP inte ligger inom det förväntade intervallet bör testet upprepas med aktiverat slam från en annan källa. EC_{50} för koppar(II)sulfatpentahydrat bör ligga i intervallet 53–155 mg/l för den totala respirationen (9).

BESKRIVNING AV TESTMETODEN

Testkärl och annan utrustning

13. Vanlig laboratorieutrustning samt följande krävs:

(a) Testkärl – t.ex. 1 000 ml bägare som kan rymma 500 ml reaktionsblandning (se punkt 5 i figur 1).

(b) Mätcell och anslutningsdon för mätning av halten löst syre, en lämplig syreelektrod, en kapslad cell som kan rymma provet utan något gasutrymme och en mätare (t.ex. 7, 8, 9 i figur 1 i tillägg 2). Alternativt kan en BOD-kolv användas med en lämplig övergångsmuff för att fästa syreelektroden mot flaskans hals (se figur 2 i tillägg 3). För att undvika förlust av undanträngd vätska när syreelektroden införs är det lämpligt att först föra in en tratt eller ett glasrör genom muffen, eller att använda kärl med utsvängda kanter. I båda fallen bör man använda en magnetomrörare eller en alternativ omrörningsmetod, t.ex. en självomrörande sond.

(c) Magnetomrörare och magnetloppor, belagda med inert material för användning i mätkammaren och/eller testkärlen.

(d) Luftningsanordning. Om så krävs leds den komprimerade luften genom ett lämpligt filter, så att partiklar och olja avlägsnas, samt genom tvättflaskor med vatten för att fuktas. Innehållet i kärlen luftas med

▼M6

pasteurpipetter eller andra luftningsanordningar som inte adsorberar kemikalier. En orbitalskak med hastigheten 150–250 rpm och med kolvar som rymmer t.ex. 2 000 ml kan användas för att tillgodose syrebehovet i slammet och lösa problemet med kemikalier som bildar stora mängder skum, är flyktiga och därför går förlorade, eller är svåra att dispergera när de luftas genom bubbling. Testsystemet består vanligen av ett antal bägare som luftas kontinuerligt, etableras sekventiellt (t.ex. med ca 10–15 minuters mellanrum) och sedan analyseras sekventiellt. Validerade instrument som möjliggör samtidig luftning och mätning av syreförbrukningshastigheten i blandningarna kan också användas.

(e) pH-mätare.

(f) Centrifug, allmän bänkcentrifug för slam med en kapacitet på 10 000 m/s^2.

Reagens

14. Reagens av analyskvalitet bör användas genomgående.

Vatten

15. Destillerat eller avjonat vatten som innehåller mindre än 1 mg/l DOC bör användas, utom då klorfritt kranvatten anges.

Syntetiskt avloppsvatten

16. Mediet bör beredas med följande beståndsdelar i angivna mängder:

— pepton	16 g
— köttextrakt (eller jämförbart vegetabiliskt extrakt)	11 g
— urea	3 g
— natriumklorid (NaCl)	0,7 g
— kalciumkloriddihydrat ($CaC1_2$, $2H_2O$)	0,4 g
— magnesiumsulfatheptahydrat ($MgSO_4$, $7H_2O$)	0,2 g
— vattenfritt kaliummonovätefosfat (K_2HPO_4)	2,8 g
— destillerat eller avjonat vatten till 1 liter	

17. Lösningens pH bör vara 7,5 ± 0,5. Om det framställda mediet inte används omedelbart ska det förvaras mörkt vid 0–4 °C i högst en vecka eller under förhållanden som inte ändrar dess sammansättning. Det bör noteras att detta syntetiska avloppsvatten är 100 gånger mer koncentrerat än det som beskrivs i OECD:s tekniska rapport *Proposed method for the determination of the biodegradability of surfactants used in synthetic detergents* av den 11 juni 1976, och att dikaliumvätefosfat dessutom har tillsatts.

▼M6

18. Alternativt kan beståndsdelarna i mediet steriliseras var för sig innan förvaring, eller så kan pepton och köttextrakt tillsättas strax innan testet utförs. Mediet bör blandas grundligt före användning och pH-värdet justeras vid behov till pH 7,5 ± 0,5.

Testkemikalie

19. En stamlösning ska beredas för lätt vattenlösliga testämnen endast upp till maximal vattenlöslighet (utfällning får inte ske). Ämnen med låg vattenlöslighet, blandningar med komponenter av olika vattenlöslighet och adsorberande ämnen bör vägas direkt i testkärlen. I dessa fall kan användning av stamlösningar vara ett alternativ om de lösta koncentrationerna av testkemikalien bestäms analytiskt i testkärlen (innan det aktiverade slammet tillsätts). Om man bereder en WAF (water accommodated fraction), är det också viktigt att göra en analytisk bestämning av de lösta koncentrationerna av testkemikalierna i testkärlen. Man bör undvika att använda organiska lösningsmedel, emulgeringsmedel eller dispergeringsmedel för att förbättra lösligheten. Behandling med ultraljud av stamlösningar och suspensioner innan de rörs om, t.ex. över natten, är möjligt när det finns tillräcklig information om testkemikaliens stabilitet under sådana förhållanden.

20. Testkemikalien kan ha en negativ inverkan på pH-värdet i testsystemet. pH-värdet i blandningar som behandlats med testkemikalien bör fastställas före testet i ett preliminärt försök, för att ta reda på om det är nödvändigt att göra en justering av pH-värdet innan huvudtestet, och återigen på samma dag som huvudtestet. Lösningar eller suspensioner av testkemikalien i vatten bör vid behov neutraliseras innan inokulatet tillsätts. Beroende på undersökningens syfte kan dock ytterligare tester utföras för att bedöma effekten av testkemikalien på slammet utan pH-justering, eftersom neutraliseringen kan påverka kemikaliens kemiska egenskaper.

21. De toxiska effekterna av flyktiga kemikalier, i synnerhet i tester där luft bubblas genom systemet, kan leda till att varierande effekter uppstår på grund av förlust av ämnet under exponeringstiden. Försiktighet bör iakttas när sådana ämnen används genom att man utför en ämnesspecifik analys av kontrollblandningar som innehåller ämnet och genom att man ändrar genomluftningen.

Referenskemikalie

22. Om 3,5-diklorfenol används som referenskemikalie bereds en lösning med 1,00 g 3,5-diklorfenol i 1 000 ml vatten (15). Varmt vatten och/eller ultraljud används för att påskynda upplösningen och späda lösningen till önskad volym när den har svalnat till rumstemperatur. Det bör dock säkerställas att referenskemikalien inte förändras strukturellt. Lösningens pH-värde kontrolleras och justeras vid behov med NaOH eller H_2SO_4 till pH 7–8.

23. Om koppar(II)sulfatpentahydrat används som referenskemikalie bereds lösningar med koncentrationerna 58 mg/l, 100 mg/l och 180 mg/l (en faktor 1,8). Ämnet vägs upp direkt i testkärlen (29 – 50 – 90 mg för en total volym på 500 ml) och löses sedan upp i 234 ml autoklaverat kranvatten. Koppar(II)sulfatpentahydrat är lättlösligt. När testet inleds tillsätts 16 ml syntetiskt avloppsvatten och 250 ml aktiverat slam.

▼M6

Specifik hämning av nitrifikation

24. En 2,32 g/l stamlösning av n-allyltiourea (ATU) bereds. Om 2,5 ml av denna lösning tillsätts i en inkuberingsblandning med slutlig volym på 500 ml blir resultatet en slutkoncentration på 11,6 mg ATU/l (10^{-4} mol/l), vilket är tillräckligt (4) för att orsaka en 100-procentig hämning av nitrifikationen i ett nitrifierande aktiverat slam som innehåller 1,5 g/l suspenderade fasta ämnen.

Abiotisk kontroll

25. I vissa sällsynta fall kan en testkemikalie med starkt reducerande egenskaper orsaka en mätbar abiotisk syreförbrukning. I sådana fall kan det vara nödvändigt att ha abiotiska kontroller för att skilja mellan testkemikaliens abiotiska syreförbrukning och mikrobiell respiration. Abiotiska kontroller kan beredas genom att man utelämnar inokulatet från testblandningarna. På samma sätt kan abiotiska kontroller utan inokulat inkluderas när analytiska stödmätningar utförs för att fastställa den uppnådda koncentrationen under testets exponeringsfas, t.ex. när man använder stamlösningar med kemikalier som är svårlösliga i vatten tillsammans med komponenter som har olika vattenlöslighet. I särskilda fall kan det vara nödvändigt att bereda en abiotisk kontroll med ett sterilt inokulat (t.ex. genom autoklavering eller tillsättning av steriliserande toxiska ämnen). Vissa kemikalier kan endast producera eller förbruka syre om ytarean är tillräckligt stor för att en reaktion ska inträffa, även om de normalt sett behöver mycket högre temperatur eller tryck för detta. I detta avseende bör särskild uppmärksamhet ägnas åt peroxidiska ämnen. Steriliserade inokulat ger en stor yta.

Inokulat

26. Aktiverat slam för allmän användning samlas in från (eller nära) utloppet på luftningstanken hos ett väl fungerande reningsverk som huvudsakligen behandlar avloppsvatten från hushåll. Beroende på testets syfte kan även andra lämpliga typer av eller källor för aktiverat slam användas, t.ex. slam som framställts i laboratoriet. Slammet ska ha en lämplig koncentration av suspenderade fasta ämnen, 2–4 g/l. Slam från olika reningsverk har dock ofta olika egenskaper och känslighet.

27. Slammet kan användas som det är när det samlas in, men grova partiklar bör avlägsnas genom sedimentering under en kort period, t.ex. 5–15 minuter, följt av dekantering av det översta skiktet med finkornigare fasta ämnen eller sållning (t.ex. genom en sikt med maskstorleken 1 mm). Alternativt kan slammet homogeniseras i blandare i ca 15 sekunder eller längre, men försiktighet krävs med tanke på de skjuvkrafter och temperaturförändringar som kan uppstå vid långa blandningstider.

28. Det är ofta nödvändigt att tvätta slammet, t.ex. om den endogena respirationshastigheten är låg. Slammet bör först centrifugeras, t.ex. i 10 minuter vid ca 10 000 m/s^2, så att det bildas en klar supernatant samt en pellet bestående av avloppsvattnets fasta beståndsdelar. Supernatanten kasseras och slammet återsuspenderas i klorfritt kranvatten under skakning. Tvättvattnet avlägsnas sedan genom att slammet åter centrifugeras och supernatanten kasseras. Tvätt och centrifugering upprepas vid behov. Torrvikten hos en känd volym av det återsuspenderade slammet fastställs, och slammet ska

▼M6

antingen koncentreras genom att vätska avlägsnas eller spädas ytterligare i klorfritt kranvatten så att man uppnår den erforderliga koncentrationen för slammets fasta beståndsdelar på 3 g/l. Det aktiverade slammet luftas kontinuerligt (t.ex. 2 l/minut) vid testtemperaturen, och det bör helst användas samma dag som det samlas in. Om detta inte är möjligt ska syntetiskt avloppsvatten (50 ml syntetiskt avloppsvatten/liter aktiverat slam) tillföras slammet dagligen i ytterligare två dagar. Slammet används därefter i testet och resultaten betraktas som giltiga, förutsatt att inga betydande förändringar av slammets aktivitet har inträffat. Detta avgörs genom en bestämning av slammets endogena heterotrofa och nitrifierande respirationshastighet.

29. Svårigheter kan uppstå om skumbildning inträffar under inkuberingsfasen i sådan omfattning att skummet och de partiklar från slammet som är suspenderade i skummet svämmar ut ur luftningskärlen. Ibland förekommer skumbildning på grund av närvaron av syntetiskt avloppsvatten, men man måste räkna med skumbildning om testkemikalien består av eller innehåller ett ytaktivt ämne. Förlust av fasta ämnen i slammet från testblandningarna leder till artificiellt minskade respirationshastigheter som felaktigt kan tolkas som en följd av hämning. Det ytaktiva ämnet koncentreras dessutom i skumlagret vid luftning av lösningen med det ytaktiva ämnet. Förlust av skum från testsystemet sänker exponeringskoncentrationerna. Skumbildningen kan kontrolleras genom enkla mekaniska metoder (t.ex. sporadisk manuell omrörning med en glasstav) eller genom att tillsätta ett skumdämpande ämne bestående av en silikonemulsion som är fri från ytaktiva ämnen och/eller genom att lufta lösningen med skakkolvmetoden. Om problemet härrör från närvaron av syntetiskt avloppsvatten bör sammansättningen av avloppsvattnet modifieras genom att man tillsätter en skumdämpande reagens, med en mängd på t.ex. 50 µl/l. Om skumbildningen orsakas av testkemikalien bör den kvantitet som behövs för att dämpa skumbildningen fastställas vid den högsta testkoncentrationen, och därefter bör alla enskilda luftningskärl behandlas identiskt (inklusive kärl i vilka inget skum förekommer, t.ex. blankprov och referenskärl). Om skumdämpande medel används bör det inte förekomma någon interaktion med inokulatet och/eller testkemikalien.

TESTFÖRFARANDE

30. Man kan fastställa hämningen av tre olika syreupptagningar: totalt, endast heterotrof, och syreupptagning på grund av nitrifikation. Normalt bör det räcka att mäta hämningen av den totala syreupptagningen. Man behöver känna till effekterna på den heterotrofa syreupptagningen vid oxidering av organiskt kol och på grund av oxidation av ammonium om det finns ett särskilt krav på dessa två endpoints för en viss kemikalie eller (alternativt) för att förklara atypiska dos-responskurvor genom hämning av den totala syreupptagningen.

Testbetingelser

31. Testet bör utföras vid en temperatur på 20 ± 2 °C.

Testblandningar

32. Testblandningar (F_T som i tabell 1) som innehåller vatten, syntetiskt avloppsvatten och testkemikalien bereds så att olika nominella koncentrationer av testkemikalien erhålls (se tabell 1 för exempel på beståndsdelarnas mängder). Vid behov justeras pH-värdet till 7,5 ± 0,5. Blandningarna späds med vatten och inokulatet tillsätts så att lika slutvolymer i kärlen uppnås och luftningen kan inledas.

Referensblandningar

33. Blandningar (F_R) bereds på samma sätt som testblandningarna, med referenskemikalien, t.ex. 3,5-diklorfenol, som ersättare för testkemikalien.

▼M6

Blankprov

34. Blankprov (F_B) bereds i början och slutet av exponeringstiden i prov där testbägarna upprättas sekventiellt med jämna mellanrum. Vid tester som görs med utrustning som möjliggör samtidiga mätningar av syreförbrukningen inkluderas minst två blankprov i varje parti som analyseras samtidigt. Blankproven ska innehålla samma volym aktiverat slam och syntetiskt medium men inga test- eller referenskemikalier. De späds med vatten till samma volym som test- och referensblandningarna.

Abiotisk kontroll

35. Vid behov, t.ex. om testkemikalien är känd för eller misstänks ha starkt reducerande egenskaper, bör en blandning F_A beredas för mätning av den abiotiska syreförbrukningen. Blandningen bör ha samma mängd testämne och syntetiskt avloppsvatten och samma volym som testblandningarna, men sakna aktiverat slam.

Allmänna förfaranden och mätningar

36. Testblandningar, referensblandningar, blankprov och abiotiska kontroller inkuberas vid testtemperaturen under forcerad luftning (0,5–1 l/min) så att halten löst syre hålls över 60–70 % mättnad och det flockade slammet förblir suspenderat. Det är också nödvändigt med omrörning i kulturerna för att se till att det flockade slammet förblir suspenderat. Inkuberingen påbörjas när inokulatet med aktiverat slam för första gången kommer i kontakt med övriga beståndsdelar i den slutliga blandningen. Vid inkuberingens slut, efter den angivna exponeringstiden på vanligtvis 3 timmar, ska prover tas för mätning av hur snabbt halten löst syre avtar i den cell som utformats för detta ändamål (figur 2 i tillägg 3) eller i en helt fylld BOD-kolv. Det sätt på vilket inkuberingarna inleds beror också på den använda utrustningens kapacitet att mäta syreförbrukningshastigheten. Om det till exempel ingår en enda syresond görs mätningarna var och en för sig. I förevarande fall måste de olika blandningar som behövs för testet av syntetiskt avloppsvatten beredas men inokulatet bör inte tillsättas, och de erforderliga volymerna slam bör tillsättas i varje kärl i satsen. Varje inkubering bör inledas successivt efter lämpligt valda intervaller på t.ex. 10–15 minuter. Alternativt kan mätsystemet utgöras av flera sonder som möjliggör flera samtidiga mätningar. I sådana fall kan inokulatet tillsättas samtidigt i lämpliga grupper med kärl.

37. Koncentrationen för det aktiverade slammet i alla test- och referensblandningar samt blankproven (men inte de abiotiska kontrollerna) är nominellt 1,5 g/l för suspenderade fasta ämnen. Syreförbrukningen bör mätas efter 3 timmars exponering. Ytterligare mätningar efter 30 minuters exponering bör utföras om så är lämpligt och på det sätt som beskrivs ovan i punkt 5.

Slammets nitrifikationspotential

38. För att avgöra om slam nitrifieras och, om så är fallet, med vilket hastighet, bör man bereda blandningar (F_B) som i blankproven och ytterligare ”kontroll”-blandningar (F_N) men som även innehåller 11,6 mg/l n-allyltiourea.

▼M6

Blandningarna luftas och inkuberas vid 20 ± 2 °C i 3 timmar. Därefter mäts syreupptagningshastigheten, och hastigheten för syreupptagning på grund av nitrifikation beräknas.

Testupplägg

Preliminärt test

39. Ett preliminärt test används vid behov för att uppskatta de koncentrationer av testkemikalien som behövs i det definitiva testet för bestämning av hämningen av syreförbrukningen. Alternativt kan det faktum att testkemikalien inte hämmar syreförbrukningen i ett preliminärt test visa att det definitiva testet är onödigt, men tre exemplar vid den högsta testade koncentrationen i det preliminära testet (vanligen 1 000 mg/l, men kravet på data avgör) bör inkluderas.

Tabell 1

Exempel på blandningar för det inledande testet

Reagens	Ursprunglig koncentration				
Stamlösning med testkemikalie	10 g/l				
Stamlösning med syntetiskt medium	Se punkt 16.				
Suspenderad stamlösning med aktiverat slam	3 g/l suspenderade fasta ämnen				
Beståndsdelar i blandningarna	Dosering i testkärlen ([a])				
	F_{T1}	F_{T2}	F_{T3-5}	F_{B1-2}	F_A
Stamlösning av testkemikalien (ml) (punkterna 19–21)	0,5	5	50	0	50
Stamlösning med syntetiskt avloppsvatten (ml) (punkt 16)	16	16	16	16	16
Suspenderad lösning med aktiverat slam (ml) (punkterna 26–29)	250	250	250	250	0
Vatten (punkt 15)	233,5	229	184	234	434
Blandningarnas totala volym (ml)	500	500	500	500	500
Koncentrationer i blandningen					
Testsuspension (mg/l) Aktiverat slam	10	10	1 000	0	1 000
(suspenderade fasta ämnen) (mg/l)	1 500	1 500	1 500	1 500	0

([a]) Samma förfarande bör följas med referenskemikalien och ge kolvarna F_{R1-3}

40. Testet bör utföras med minst tre koncentrationer av testkemikalien, t.ex. 10 mg/l, 100 mg/l och 1 000 mg/l med ett blankprov och, vid behov, minst tre abiotiska kontroller med den högsta koncentrationen av testkemikalien (se tabell 1 som exempel). Helst ska de lägsta koncentrationerna inte ha

▼M6

någon inverkan på syreförbrukningen. Syreupptagningshastigheterna och nitrifikationshastigheten bör beräknas (om tillämpligt), och därefter bör den procentuella hämningen beräknas. Beroende på testets syfte är det även möjligt att helt enkelt fastställa toxiciteten för en koncentrationsgräns, t.ex. 1 000 mg/l. Om det inte förkommer några statistiskt signifikanta toxiska effekter vid denna koncentration är det inte nödvändigt att utföra ytterligare tester vid högre eller lägre koncentrationer. Det bör noteras att ämnen som är svårlösliga i vatten, blandningar med komponenter som har olika vattenlöslighet och adsorberande ämnen bör vägas upp direkt i testkärlen. I detta fall ska den volym som reserverats för stamlösningen med testämnet ersättas med utspädningsvatten.

Definitivt test

Hämning av den totala syreupptagningen

41. Testet bör utföras med en serie koncentrationer som härleds från det preliminära testet. För att få fram både NOEC och EC_x (t.ex. EC_{50}) bör man i de flesta fall ha sex kontroller och fem testkoncentrationer i en geometrisk serie med fem replikat. Den abiotiska kontrollen behöver inte upprepas om det inte förelåg någon syreupptagning i det preliminära testet, men om det förekom betydande syreupptagning bör abiotiska kontroller inkluderas för varje koncentration av testkemikalien. Slammets känslighet bör kontrolleras med hjälp av referenskemikalien 3,5-diklorfenol. Slammets känslighet bör kontrolleras för varje testserie, eftersom känsligheten ofta varierar. Under alla omständigheter ska prover tas från testkärlen efter 3 timmar, och vid behov efter ytterligare 30 minuter, för mätning av syreupptagningshastigheten i syreelektrodcellen. På basis av insamlade data kan kontrollens och testblandningarnas särskilda respirationshastigheter beräknas, och den procentuella hämningen beräknas sedan med hjälp av ekvation 7 nedan.

Differentiering mellan hämningen av den heterotrofa respirationen och nitrifikationen

42. Genom användning av den särskilda nitrifikationshämmaren, ATU, kan man direkt bedöma de hämmande effekterna av testkemikalierna på den heterotrofa oxideringen, och genom att subtrahera syreupptagningshastigheten med ATU från den totala upptagningshastigheten (utan ATU), kan effekterna på nitrifikationshastigheten beräknas. Två uppsättningar med reaktionsblandningar bör beredas i enlighet med de testupplägg för EC_x eller NOEC som beskrivs i punkt 41, men ATU bör dessutom läggas till för varje blandning i en uppsättning med en slutlig koncentration på 11,6 mg/l, vilket har visat sig hämma nitrifikationen helt i slam med koncentrationer för suspenderade fasta ämnen på upp till 3 000 mg/l (4). Syreupptagningshastigheterna bör mätas efter exponeringstiden. Dessa direkta värden representerar endast den heterotrofa respirationen, och skillnaderna mellan dessa och motsvarande värden för den totala respirationen utgörs av nitrifikationen. De olika graderna av hämning ska därefter beräknas.

Mätningar

43. Efter exponeringstiden överförs ett prov från det första luftningskärlet till syreelektrodcellen (figur 1 i tillägg 2) och halten löst syre mäts omedelbart. Om ett system med flera elektroder finns att tillgå kan mätningarna göras samtidigt. Det är av avgörande betydelse att omrörning (med hjälp av en belagd magnet) sker i samma takt som när elektroden kalibrerades för att se till att sonden svarar med minimal fördröjning på de växlande syrekoncentrationerna och för att möjliggöra regelbundna och reproducerbara mätningar

▼M6

av syre i mätkärlet. Det är ofta tillräckligt med det självomrörande sondsystem som vissa syreelektroder är utrustade med. Cellen bör sköljas med vatten mellan mätningarna. Alternativt kan provet användas för att fylla en BOD-kolv (figur 2 i tillägg 3) försedd med en magnetisk omrörare. En syresond med en övergångsmuff förs sedan in i flaskans hals och magnetomröraren sätts på. I båda fallen mäts halten löst syre kontinuerligt och registreras under en viss tid, vanligen fem till tio minuter eller till dess att syrekoncentrationen fallit under 2 mg/l. Elektroden avlägsnas därefter, och blandningen återförs till luftningskärlet, där luftningen och omrörningen fortsätter om det är nödvändigt att göra mätningar efter längre exponeringstider.

Kontroll av testkemikaliens koncentration

44. För vissa ändamål kan det vara nödvändigt att mäta koncentrationen av testkemikalien i testkärlen. Det bör noteras att om stamlösningar av

— ämnen som är svårlösliga i vatten,

— blandningar som innehåller ämnen med olika vattenlöslighet, eller

— ämnen med hög vattenlöslighet men där stamlösningens koncentration ligger nära den högsta vattenlösligheten

används är den lösta delen okänd, och den verkliga koncentrationen av testkemikalien som överförs till testkärlen är okänd. För att karakterisera exponeringen är det nödvändigt att göra en analytisk bedömning av testkemikaliens koncentrationer i testkärlen. För att förenkla saken bör den analytiska bedömningen utföras innan inokulatet tillsätts. Eftersom endast upplösta fraktioner överförs till testkärlen kan de uppmätta koncentrationerna vara mycket låga.

45. För att undvika tidsödande och dyra analyser är det bäst att helt enkelt väga testkemikalien i testkärlen och att hänvisa till den ursprungliga vägda nominella koncentrationen för påföljande beräkningar. Det är inte nödvändigt att differentiera mellan upplösta, oupplösta eller adsorberade fraktioner av testkemikalien eftersom alla dessa fraktioner förekommer även under verkliga förhållanden i ett reningsverk, och de kan variera beroende på sammansättningen av avloppsvattnet. Syftet med testmetoden är att göra en bedömning av en icke-hämmande koncentration under realistiska förhållanden, och det är inte lämpligt att i detalj undersöka vilka fraktioner som bidrar till hämningen av organismerna i det aktiverade slammet. Slutligen bör de adsorptiva ämnena också vägas direkt i testkärlen, och kärlen bör silaniseras för att minimera förlusterna genom adsorption.

DATA OCH RAPPORTERING

Beräkning av syreupptagninghastigheter

46. Syreupptagningshastigheterna bör beräknas utifrån medelvärdet av de uppmätta värdena, t.ex. utifrån den linjära delen av kurvorna för syrekoncentrationen avsatt mot tiden, och beräkningarna bör då inskränkas till syrekoncentrationer på mellan 2,0 mg/l och 7,0 mg/l eftersom högre och lägre koncentrationer i sig kan påverka förbrukningshastigheten. Avvikelser till koncentrationsintervaller under eller över dessa värden är ibland oundvikliga

▼M6

och nödvändiga, t.ex. när respirationen är starkt hämmad och följaktligen mycket långsam, eller om ett visst aktiverat slam respirerar mycket snabbt. Detta kan godtas under förutsättning att de utvidgade delarna av upptagningskurvan är raka och deras lutningar inte ändras när de passerar gränsvärdena på 2,0 mg/l eller 7,0 mg/l O_2. Alla böjda delar av kurvan visar att mätsystemet håller på att stabiliseras eller att upptagningshastigheten håller på att ändras, och de bör inte användas för beräkning av respirationen. Syreupptagningshastigheten bör uttryckas i milligram per liter per timme (mg/lh) eller milligram per gram torrt slam per timme (mg/gh). Syreförbrukningshastigheten, R, i mg/lh kan beräknas eller interpoleras från den linjära delen av den registrerade syreminskningskurvan enligt ekvation 1:

$$R = (Q_1 - Q_2)/\Delta_t \times 60 \qquad (1)$$

där

Q_1 är syrekoncentrationen i början av det utvalda avsnittet av den linjära fasen (mg/l),

Q_2 är syrekoncentrationen i slutet av det utvalda avsnittet av den linjära fasen (mg/l),

Δ_t är tidsintervallet mellan dessa två mätningar (min.).

47. Den särskilda respirationshastigheten (R_S) uttrycks som mängden förbrukat syre per g torrvikt slam per timme (mg/gh) enligt ekvation 2:

$$R_s = R/SS \qquad (2)$$

där SS är koncentrationen av de suspenderade fasta ämnena i testblandningen (g/l).

48. De olika exponenterna för R som kan kombineras är följande:

S särskild hastighet

T total respirationshastighet

N hastighet på grund av respiration genom nitrifikation

H hastighet på grund av heterotrof respiration

A hastighet på grund av abiotiska processer

B hastighet baserad på blankprov (medelvärde)

Beräkning av syreupptagningshastigheten på grund av nitrifikation

49. Förhållandet mellan den totala resprationen (R_T), respirationen genom nitrifikation (R_N) och den heterotrofa respirationen (R_H) beräknas med formel 3:

$$R_N = R_T - R_H \qquad (3)$$

där

R_N är syreupptagningshastigheten på grund av nitrifikation (mg/lh),

R_T är den uppmätta syreupptagningshastigheten i blankprovet (ingen ATU; F_B) (mg/lh),

R_H är den uppmätta syreupptagningshastigheten i blankprovet med tillsats av ATU (F_N) (mg/lh).

▼M6

50. Detta förhållande gäller för blankvärden (R_{NB}, R_{TB}, R_{HB}), abiotiska kontroller (R_{NA}, R_{TA}, R_{HA}) och prover med testkemikalier (R_{NS}, R_{TS}, R_{HS}) (mg/gh). Särskilda respirationshastigheter beräknas utifrån

$$R_{NS} = R_N/SS \quad (4)$$

$$R_{TS} = R_T/SS \quad (5)$$

$$R_{HS} = R_H/SS \quad (6)$$

51. Om R_N är obetydligt stor (t.ex. < 5 % av R_T i blankproven) i ett preliminärt test kan man utgå från att den heterotrofa syreupptagningen är lika med den totala upptagningen och att ingen nitrifikation pågår. En alternativ källa för aktiverat slam behövs om testerna ska ta hänsyn till effekterna på heterotrofa och nitrifierande mikroorganismer. Ett definitivt test utförs om det finns tecken på hämmade syreupptagningshastigheter med olika koncentrationer av testkemikalien.

Beräkning av den procentuella hämningen

52. Den procentuella hämningen I_T av den totala syreförbrukningen vid varje koncentration av testkemikalien kan beräknas med ekvation 7:

$$I_T = [1 - (R_T - R_{TA})/R_{TB}] \times 100\ \% \quad (7)$$

53. På samma sätt kan den procentuella hämningen av den heterotrofa syreupptagningen I_H vid varje koncentration av testkemikalien beräknas med ekvation 8:

$$I_H = [1 - (R_H - R_{HA})/R_{HB}] \times 100\ \% \quad (8)$$

54. Slutligen kan hämningen av syreupptagningen på grund av nitrifikation IN vid varje koncentration beräknas med ekvation 9:

$$I_N = [1 - (R_T - R_H)/(R_{TB} - R_{HB})] \times 100\ \% \quad (9)$$

55. Den procentuella hämningen av syreupptagningen plottas mot logaritmen av testkemikaliens koncentration (hämningskurva, se figur 3 i tillägg 4). Hämningskurvor plottas för varje luftningsperiod på 3 timmar eller dessutom efter ytterligare 30 minuter. Den koncentration av testkemikalien som hämmar syreupptagningen med 50 % (EC_{50}) bör beräknas eller interpoleras utifrån kurvan. Om lämpliga data finns tillgängliga, kan de 95-procentiga konfidensgränserna för EC_{50}, kurvans lutning, och lämpliga värden som markerar början (till exempel EC_{10} eller EC_{20}) och slutet av hämningsintervallet (till exempel EC_{80} eller EC_{90}) beräknas eller interpoleras.

56. Det bör noteras att det mot bakgrund av den variabilitet som ofta förekommer i resultaten i många fall kan vara tillräckligt att redovisa resultaten i storleksordning, till exempel

EC_{50} < 1 mg/l

EC_{50} 1 mg/l till 10 mg/l

EC_{50} 10 mg/l till 100 mg/l

EC_{50} > 100mg/l

Tolkning av resultaten

EC_x

▼M6

57. EC_x-värden, inklusive deras sammanhörande nedre och övre 95-procentiga konfidensgränser för parametern i fråga, beräknas med hjälp av lämpliga statistiska metoder (t.ex. probit-analys, logistiska funktioner eller Weibull-funktioner, den modifierade Spearman-Kärbermetoden eller enkel interpolering (11)). EC_x beräknas genom att ett värde som motsvarar x % av medelvärdet för kontrollen införs i den ekvation som erhållits. För att beräkna EC_{50} eller något annat EC_x-värde bör en regressionsanalys utföras på medelvärdena för varje testkärl (x).

Uppskattning av NOEC

58. Om en statistisk analys används för att bestämma NOEC är det nödvändigt att sammanställa statistiska uppgifter för varje enskilt kärl (enskilda kärl anses utgöra replikat). Lämpliga statistiska metoder bör användas i enlighet med OECD:s dokument *Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application* (11). I allmänhet ska negativa effekter av testkemikalien jämfört med kontrollsubstansen undersökas genom en ensidig (mindre) hypotesprövning vid $p \leq 0{,}05$.

Testrapport

59. Testrapporten ska innehålla följande information:

Testkemikalie

— trivialnamn, kemiskt namn, CAS-nummer, renhet,

— fysikalisk-kemiska egenskaper (t.ex. log K_{ow}, vattenlöslighet, ångtryck, Henrys konstant (H) och helst information om testkemikaliens omvandling, spridning och fördelning, t.ex. adsorption till aktiverat slam),

Testsystem

— källa, villkor för drift av reningsverk och inflöde, koncentration, förbehandling och underhåll av det aktiverade slammet,

Testbetingelser

— temperatur, pH under testet och exponeringens varaktighet,

Resultat

— kontrollernas specifika syreförbrukning (mg O_2/(g slam × h),

— alla uppmätta data, hämningskurva/-kurvor och metod för beräkning av EC50,

— EC50 och, om möjligt, 95-procentiga konfidensgränser; eventuellt EC20, EC80. Eventuellt NOEC och de använda statistiska metoderna om EC50 inte kan fastställas,

— resultat för den totala hämningen och, om så är lämpligt, den heterotrofa hämningen och nitrifikationshämningen,

— abiotisk syreupptagning i den fysikalisk-kemiska kontrollen (om sådan används),

— namn på referenskemikalien och de resultat som erhållits med denna kemikalie,

— alla iakttagelser och avvikelser från det normala förfarandet som kan ha inflytande på resultatet.

LITTERATUR

(1) Brown, D., Hitz, H. R. och Schäfer, L. (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) King, E. F. och Painter H. A. (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. Testriktlinje nr 209, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris.

(4) ISO (2007). ISO 8192 Vattenundersökningar – Metod för bestämning av hämning av syreförbrukning hos mikroorganismer i aktivt slam (kol- och ammonium-oxidation), Internationella standardiseringsorganisationen.

(5) Bealing, D. J. (2003). Dokument ISO/TC147/WGI/N.183, Internationella standardiseringsorganisationen.

(6) Painter, H. A. och Jones, K. (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) Painter, H. A. (1986). Testing the toxicity of chemicals by the inhibition of respiration of activated sludge. *Toxicity Assessment* 1: 515–524.

(8) Robra, B. (1976). Wasser/Abwasser 117, 80.

(9) Fiebig S. och Noack, U. (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 Nr 12b: 1556–1557.

(10) ISO (1995). ISO 10634 Vattenundersökningar – Handledning för beredning och handhavande av i vatten svårlösliga organiska föreningar för efterföljande utvärdering av deras bionedbrytbarhet i vattenlösning, Internationella standardiseringsorganisationen.

(11) OECD (2006). Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application, Series on testing and assessment nr 54, ENV/JM/MONO(2006)18, OECD, Paris.

▼**M6**

Tillägg 1

Definitioner

Följande definitioner gäller för denna testmetod.

Kemikalie: ett ämne eller en blandning.

ECx (koncentration som orsakar x % effekt): den koncentration som orsakar en x-procentig effekt på testorganismerna efter en given exponeringstid jämfört med ett kontrollprov. EC_{50} är till exempel den koncentration som beräknas ha en effekt för en av testets endpoints på 50 % av en exponerad population under en fastställd exponeringstid.

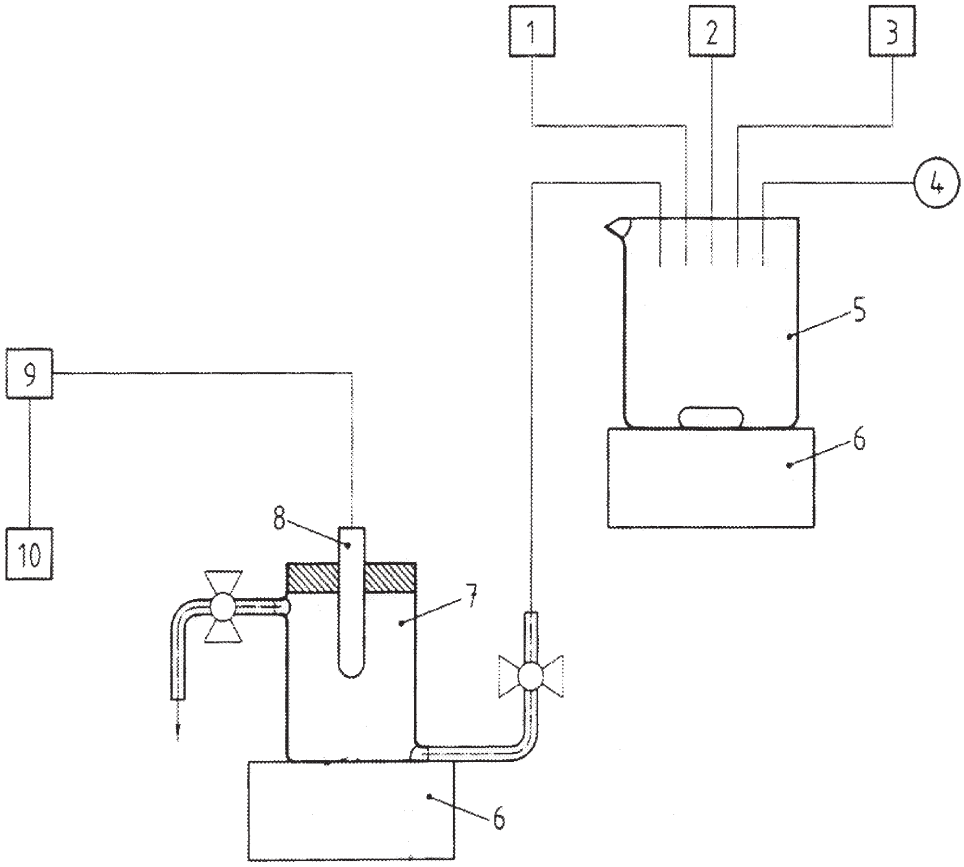
Nolleffektkoncentrationen (NOEC, no observed effect concentration): den högsta koncentrationen av testkemikalien vid vilken ingen effekt har observerats. I detta test har en halt som motsvarar NOEC ingen statistiskt signifikant effekt ($p < 0,05$) efter en given exponeringstid jämfört med ett kontrollprov.

Testkemikalie: alla ämnen eller blandningar som testas med denna testmetod.

▼**M6**

Tillägg 2

Figur 1 **Exempel på mätenhet**



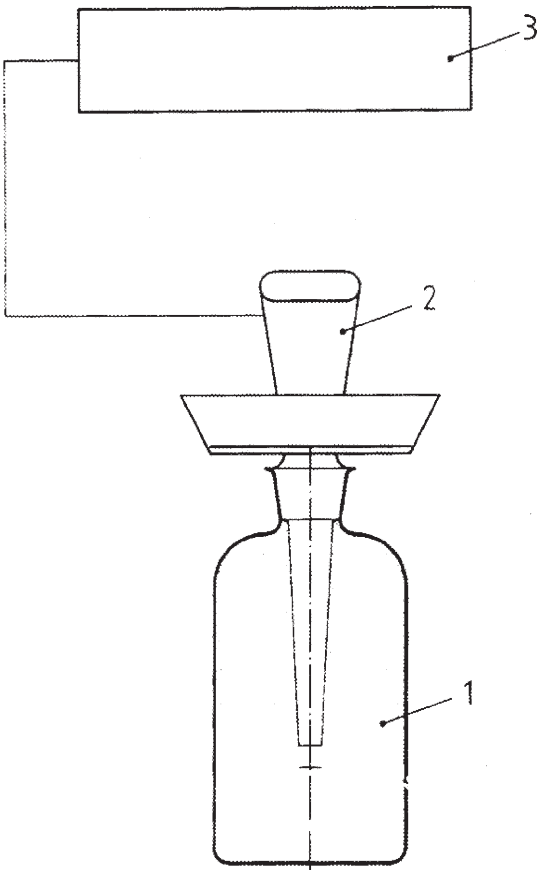
Teckenförklaring

1	aktiverat slam	6	magnetomrörare
2	syntetiskt medium	7	mätcell för syre
3	testkemikalie	8	syreelektrod
4	luft	9	mätinstrument för syre
5	blandningskärl	10	registreringsinstrument

▼**M6**

Tillägg 3

Figur 2: **Exempel på mätenhet vid användning av BOD-kolv**



Teckenförklaring

1 testkärl

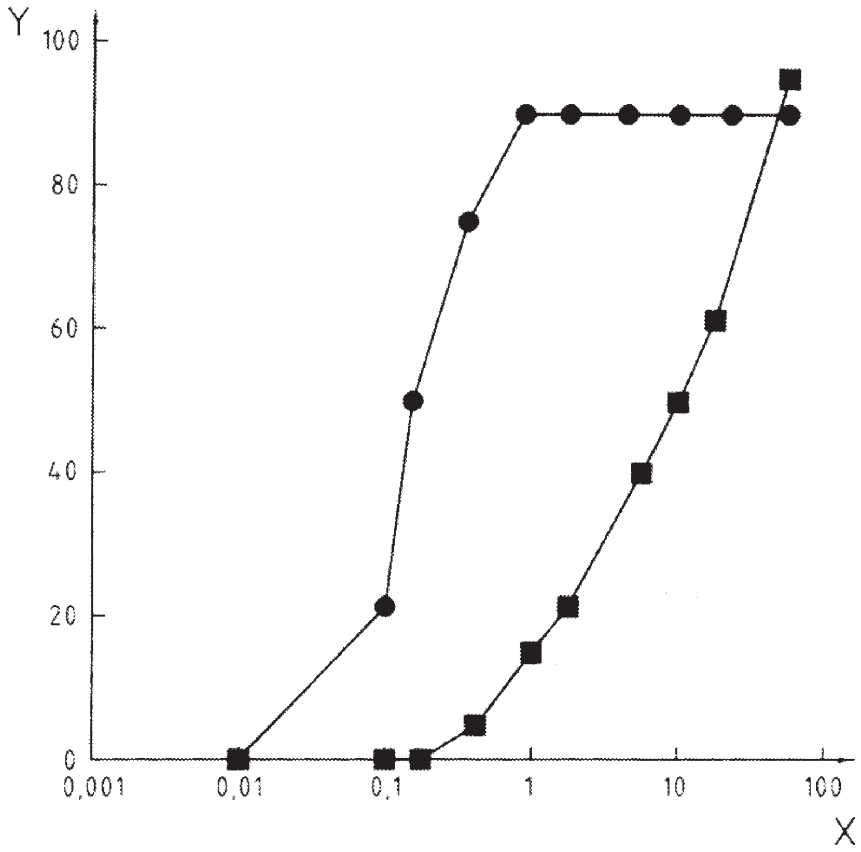
2 syreelektrod

3 mätinstrument för syre

▼**M6**

Tillägg 4

Figur 3: **Exempel på hämningskurvor**



Teckenförklaring

X koncentration av 3,5-diklorfenol (mg/l)

Y hämning (%)

■ hämning av heterotrof respiration vid användning av ett nitrifierande slam

● hämning av nitrifiering vid användning av ett nitrifierande slam.

▼B

C.12 BIOLOGISK NEDBRYTBARHET

MODIFIERAT SCAS-TEST

1. METOD

1.1 INLEDNING

Syftet med denna metod är att bedöma den potentiella fullständiga bionedbrytbarheten av vattenlösliga, icke-flyktiga organiska ämnen när dessa utsätts för relativt höga koncentrationer av mikroorganismer under en längre perioder. Under denna period hålls mikroorganismerna vid liv genom daglig tillförsel av näring bestående av bottensatsen av spillvatten. (I samband med helgen kan spillvattnet förvaras vid 4 ^{o}C. Alternativt kan det syntetiska spillvattnet till OECD Confirmatory test användas.)

Fysikalisk-kemisk adsorbtion kan inträffa på de suspenderade fasta ämnena, vilket man måste ta hänsyn till vid tolkningen av resultaten (se 3.2).

Till följd av den flytande fasens långa uppehållstid (36 timmar), och den med mellanrum tillförda näringen, simulerar testet inte de normala villkoren i en spillvattenanläggning. De resultat som uppnås med olika testämnen visar att denna metod har en hög bionedbrytningspotential.

De förhållanden som skapas i denna metod underlättar i hög grad val och/eller adaption av mikroorganismer som är i stånd till att bryta ned testämnet. (Detta förfarande kan dessutom användas för att framställa acklimatiserade inokulat för användning i andra test.)

I detta test bedöms testämnenas fullständiga bionedbrytbarhet genom mätning av koncentrationen av upplöst organiskt kol (DOC). Koncentrationen av DOC bör hellre bestämmas efter upprensning av den sura lösningen än som skillnaden mellan total C och oorganiskt C.

Vid samtidig användning av en specifik analysmetod kan testämnet primära nedbrytbarhet (nedbrytning av en ursprunglig kemisk förbindelse) bedömas.

Denna metod kan endast användas på organiska testämnen som vid den i analysen använda koncentrationen

— är lösliga i vatten,

— har ett obetydligt ångtryck,

— inte hämmar bakterierna,

— inte absorberas väsentligt i testsystemet,

— inte förloras genom att testämnet skummar.

Testämnet innehåll av organiskt kol ska vara känt.

▼B

Upplysningar om de relativa mängder av testämnets huvudbeståndsdelar kan vara till h)älp vid tolkningen av de uppnådda resultaten, särskilt när resultaten är låga eller marginella.

Upplysningar om ämnets toxicitet för mikroorganismer kan vara användbar vid tolkningen av låga resultat och vid valet av en lämplig testkoncentration.

1.2 DEFINITIONER OCH ENHETER

C_T = Koncentration av organiskt kol i testämnet, i närvaro eller frånvaro av bottensats av spillvatten i början av luftningsperioden (mg/l).

C_t = Koncentrationen av upplöst organiskt kol i den överstående vätskan vid avslutningen av luftningsperioden (mg/l).

C_c = Koncentrationen av upplöst organiskt kol i kontrollens överstående vätska vid avslutning av luftningsperioden (mg/l).

Bionedbrytbarheten definieras i detta test som förlusten av organiskt kol. Bionedbrytningen kan uttryckas som:

1. Den procentuella förlusten av D_{da} av den mängd ämne som tillförs dagligen:

$$D_{da} = \frac{C_T - (C_T - C_c)}{C_T} \times 100 \qquad [1]$$

där:

D_{da} = nedbrytning/daglig tillförsel.

2. Den procentuella förlusten av D_{ssd} av den mängd somm finns närvarande vid varje dags början:

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

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

där:

D_{ssd} = nedbrytning/ämne vid dagens början.

Indexen i och (i + 1) hänvisar till testdagen.

Utjämning 2(a) rekommenderas om spillvattnets innehåll av upplöst organiskt kol varierar från dag till dag medan utjämning 2(b) kan användas när mängden av upplöst organiskt kol är förhållandevis konstant från dag till dag.

▼B

1.3 REFERENSÄMNEN

I vissa fall kan referensämnen vara användbara vid undersökning av ett nytt ämne. Ett bestämt referensämne kan dock inte rekommenderas.

Upplysningar om flera olika ämnen som är utvärderade i ringtester tillhandahålls (se tillägg 1) först och främst för att testmoden av och till kan kalibreras, men också för att resultaten kan jämföras om en annan metod används.

1.4 TESTMETODSPRINCIP

Aktiverat slam från ett biologiskt reningsverk placeras i en semikontinuerlig slamenhet (SCAS = semi-continous activated sludge). Testämnet och bottensatsen av spillvatten från hushåll tillförs och blandningen luftas i 23 timmar. Luftningen stoppas sedan och slammet ges tid att sätta sig och överstående vätska kasseras.

I det slam som finns kvar i luftningskammaren blandas sedan en ytterligare passande mängd av testämnet, varefter cykeln upprepas.

Bionedbrytning konstateras genom bestämning av innehållet av upplöst organiskt kol i överstående vätska. Detta resultat jämförs med resultaten från analysen av vätskan från en kontrollenhet, som endast tillförts bottensats av spillvatten.

Om en specifik analysmetod används kan änderingar av koncentrationen av den ursprungliga ämnet till följd av bionedbrytning mätas (primär bionedbrytbarhet).

1.5 KVALITETSKRITERIER

Denna metods reproducerbarhet, grundad på förlust av upplöst organiskt kol, är ännu inte fastställd. (I fråga om primär bionedbrytning har mycket tillfredsställande data uppnåtts för lätt ned-brytliga ämnen.)

Metodens känslighet är avhängig i vilken utsträckning variabiliteten i blindproven och i mindre grad av den korrekthet med vilken innehållet av upplöst organiskt kol kan bestämmas, eller av vätskans innehåll av testämne vid inledningen av varje enskild cykel.

1.6 METODBESKRIVNING

1.6.1 *Förberedelse*

Ett tillräckligt antal rena luftningsenheter, alternativt kan den ursprungliga 1,5 liters SCA-testenheten användas, och lufttillförselslangar (figur 1) för varje enskild testämne och till kontrollen sätts ihop. Den komprimerade luft som tillförs testenheterna rensas med ett vaddfilter och bör vara fri från organiskt kol och vara mättat med vatten för att minska ångförlust.

Ett prov av blandad vätska, innehållande 1–4 g suspenderat fast ämne/l, tas från en aktiverad slamanläggning. Cirka 150 ml av den blandade vätskan krävs för varje luftenhet.

▼B

Stamlösningar av testämnet framställs i destillerat vatten. Normalt krävs en koncentration av 400 mg organiskt kol per liter, vilket ger en koncentration av testämnet av 20 mg/l vid inledningen av varje luftningscykel, såvida inte bionedbrytning inträffar.

Högre koncentrationer kan användas om toxiciteten för mikroorganismer tillåter detta.

Slamlösningarnas innehåll av organiskt kol mäts.

1.6.2 *Testbetingelser*

Testet bör utföras vid 20–25 °C.

En hög koncentration av aeroba mikroorganismer (1–4 g suspenderad fast ämne per liter) används, och den effektiva uppehållstiden är 36 timmar. Det kolämneinnehållande materialet i det tillförda spillvattnet oxideras grundligt, normalt inom åtta timmar efter inledning av varje enskild luftningscykel. Därefter respirerar slammet endogent under resten av luftningsperioden, under vilken det enda tillgängliga substratet är testämnet, om inte också detta metaboliseras snabbt. Dessa förhållanden, kombinerade med daglig återinokulation av proven när spillvatten från hushåll används som medium, ger mycket goda förhållanden för såväl acklimatisering som en hög grad av bionedbrytning.

1.6.3 *Genomförande av testet*

Man framställer ett prov av blandad vätska från en laboratorieenhet som övervägande behandlar spillvatten från hushåll eller från en lämplig aktiverad slamanläggning, varvid proven förvaras under aeroba förhållanden tills de används i laboratoriet. Varje luftningsenhet samt kontrollenheten fylls på med 150 ml (om det ursprungliga SCAS-testet används multipliceras de angivna volymerna med 10) blandad vätska, och luftning inleds. Efter 23 timmar stoppas luftningen och slammet får sätta sig i 45 minuter. Hanen på varje kolv öppnas successivt och 100 ml överstående vätska uttas. Ett prov av bottensatsen av spillvatten från hushåll tas omedelbart före användning och 100 ml av detta tillsätts det resterande slammet i varje luftningsenhet. Luftningen inleds på nytt. På detta stadium tillsätts inget testämne. Enheterna tillsätts dagligen spillvatten från hushåll men endast upp till den tidpunkt utfällningen resulterar i en klar överstående vätska. Detta tar normalt upp till två veckor, varefter det upplösta organiska kolet i den överstående vätskan vid avslutningen av varje luftningscykel närmar sig ett konstant värde.

Vid avslutningen av denna tidsperiod blandas de olika bottensatserna av slamproverna och 50 ml av detta blandade slamprov tillsätts till varje enhet.

95 ml bottensats av spillvatten och 5 ml vatten tillsätts till kontrollenheterna, och 95 ml av bottensatsen av spillvattnet plus 5 ml av den ifrågavarande stamlösningen av testämnet (400 mg/l) till testenheterna. Luftningen påbörjas på nytt och fortsätter i 23 timmar. Slammet sätter sig i 45 minuter och överstående vätska avlägsnas och analyseras för upplöst organiskt kol.

Ovanstående påfyllnings- och avtappningsförfarande upprepas dagligen under hela testet.

▼B

Innan utfällning kan det vara nödvändigt att tvätta enheternas väggar för att förhindra ackumulering av fasta ämnen över vätskenivån. Lör att undvika korskontaminering används en separat skrapa eller borste för varje enskild enhet.

Idealt bör innehållet av upplöst organiskt kol i överstående vätskor bestämmas dagligen, även om mindre regellbundna analyser kan tillåtas. Före analysen filtreras vätskorna genom tvättade membranfilter med en porstorlek av 0,45 μm, eller så centritugeras vätskorna. Membranfilter är lämpliga om det är fastställt att de varken avger kolämne eller adsorberar ämnet under filtrering. Provens temperatur får inte översiga 40 ^{o}C så länge det är i centrifugen.

Testens varaktighet är obestämd för ämnen som uppvisar obetydlig eller ingen bionedbrytning. Erfarenheten visar att detta bor vara minst tolv veckor, men inte längre än 26 veckor.

2. DATA OCH UTVÄRDERING

Värdena för innehållet av upplöst organiskt kol i de överstående vätskorna i kontrollenheten avbildas mot tiden i ett koordinatsystem.

Efterhand som bionedbrytning sker närmare sig nivån i testenheten nivån i kontrollenheten. När skillnaden mellan de två nivåerna är konstant vid tre på varandra följande mätningar genomförs ett tillräckligt stort antal ytterligare mätningar för en statistisk behandling av data, och den procentuella bionedbrytningen av testämnet beräknas (D_{da} eller D_{ssd}, se 1.2).

3. RAPPORTERING

3.1 TESTRAPPORT

Testrapporten ska om möjligt innehålla följande:

— Fullständiga uppgifter om slag av spillvatten, om vilken typ av enhet som har använts samt om försöksresultaten rörande testämnet, ett eventuellt referensämne, och blindproven.

— Temperatur.

— Kurva för förlusten av organiskt kol, med beskrivning av beräkningsmetoden (se 1.2).

— Datum och plats för provtagning av aktiverat slam och spillvatten, status angående adaption, koncentration, osv.

— Vetenskapliga motiveringar för eventuella ändringar av testförfarandet.

— Underskrift och datum.

▼B

3.2 TOLKNING AV RESULTAT

Eftersom det ämne som kan testas med denna metod inte kommer att vara lätt bionedbrytligt kommer förlusten av organiskt kol, som uteslutande beror på bionedbrytning, normalt att ske gradvis över dagar eller veckor, undantaget sådana fall där acklimatiseringen är plötslig, vilket framgår av en abrupt förslut efter några veckor.

Fysikalisk-kemisk adsorbtion kan emellertid i vissa fall spela en betydande roll. Detta är fallet när det vid inledningen inträder ett fullständigt eller ett delvist försvinnande av det tillsatta upplösta organiska kolet. Vad som därefter inträffar beror på olika faktorer, såsom adsorptionsgraden och koncentrationen av suspenderat fast ämne i det kasserade spillvattnet. Skillnaden mellan koncentrationen av upplöst organiskt kol i kontroll- och testenheternas överstående vätska ökar normalt gradvis från det först inträffade värdet, och denna skillnad förblir sedan vid det nya värdet under resten av testet, såvida inte acklimatisering sker.

När man ska skilja mellan bionedbrytning (eller delvis bionedbrytning) och adsorption krävs ytterligare analyser. Detta kan göras på flera sätt, men den mest pålitliga metoden är att använda överstående vätska, eller slam, som inokulat i en basistest (helst ett respirometiskt test).

Testämnen som resulterar i ett omfattande, icke-adsorptivt försvinnande av upplöst organiskt kol bör i denna test betraktas som potentiellt bionedbrytbara. Delvist icke-adsorptivt försvinnande tyder på att ämnet i varje fall är bionedbrytbart till viss grad.

Obetydligt eller inget försvinnande av upplöst organiskt kol kan bero på testämnets hämning av mikroorganismer. Detta kan också avslöja lysis och förlust av slam vilket ger oklara överstående vätskor. Testet bör i sådana fall göras om med användning av en lägre koncentration av testämnet.

Användning av en specifik analysmetod eller C-14-markerat testämne kan ge större känslighet. Om ett C-14-testämne används kommer återhämtning av $^{14}CO_2$ att bekräfta att bionedbrytning inträffat.

Om det dessutom anges resultat för primär bionedbrytning bör det om möjligt ges en förklaring på den förändring av den kemiska strukturern som medför att det ursprungliga testämnet inte kan påvisas.

Valideringen av analysmetoden ska anges tillsammans med värdena för blindprovmediet.

4. HÄNVISNINGAR

1. OECD (1981), *Test Guideline 302 A,* rådets beslut K(81) 30 slutlig.

▼B

Tillägg 1

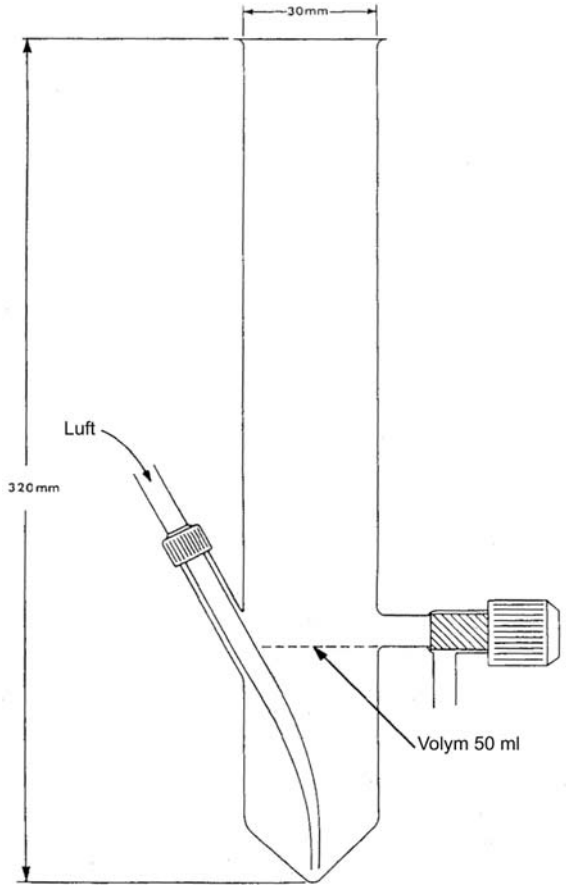
SCAS-test: Exempel på resultat

Ämne	c_T (mg/l)	C_t- C_c (mg/l)	Procent bioned-brytning	Testets längd (dagar)
4-acetylaminobensulfonat	17,2	2,0	85,0	40
Tetrapropylenbenzensulfonat	17,3	8,4	51,4	40
4-nitrofenol	16,9	0,8	95,3	40
Dietylenglykol	16,5	0,2	98,8	40
Anilin	16,9	1,7	95,9	40
Cyklopentantetrakavoxylat	17,9	3,2	81,1	120

▼B

Tillägg 2

Exempel på apparatur



▼M7

C.13 BIOACKUMULERING I FISK: EXPONERING VIA VATTEN OCH FÖDA

INLEDNING

Denna testmetod motsvarar OECD:s testriktlinje (TG) 305 (2012). Revisionen av denna testmetod har ett dubbelt syfte. För det första är syftet att inbegripa ett lämpligt bioackumuleringstest med exponering via föda ([1]) för att fastställa bioackumuleringspotentialen hos ämnen med mycket dålig upplösningsförmåga i vatten. Det andra syftet är att skapa en testmetod där man om så är lämpligt använder färre fiskar av djurskyddsskäl, samtidigt som den är mer kostnadseffektiv.

Under de år som gått sedan den konsoliderade testmetoden C.13 (1) antogs har många ämnen testats och både laboratorierna och tillsynsmyndigheterna har vunnit avsevärd erfarenhet. Detta har lett till slutsatsen att testets komplexitet kan minskas om specifika kriterier är uppfyllda (jfr punkt 88) och att en stegvis strategi kan tillämpas. Erfarenheten har också visat att biologiska faktorer som tillväxt och fetthalt hos fisk kan ha en stark inverkan på resultaten och därför kan behöva beaktas. Dessutom har man insett att det kanske inte är tekniskt möjligt att testa ämnen som har en mycket dålig upplösningsförmåga i vatten. För ämnen med mycket dålig upplösningsförmåga i vatten i vattenmiljön kan exponering via vatten vara av begränsad betydelse jämfört med administrering via föda. Detta har lett till utvecklingen av en testmetod där fisk exponeras via föda (jfr punkterna 7–14 samt 97 ff.). Validering (provningsjämförelse) av testet med exponering via föda gjordes 2010 (51).

De viktigaste förändringarna är följande:

— Testning av endast en testkoncentration kan anses vara tillräcklig om det är sannolikt att biokoncentrationsfaktorn (BCF) är oberoende av testkoncentrationen.

— En minimerad testutformning med exponering i vatten, där ett minskat antal provpunkter är möjliga om särskilda kriterier är uppfyllda.

— Fiskens fetthalt bör mätas så att BCF kan uttryckas på grundval av 5 % fetthalt.

— Ökad betoning på kinetisk BCF-bestämning (när det är möjligt) förutom att uppskatta BCF i stabilt tillstånd.

— Test med exponering via föda kommer att föreslås för vissa grupper av ämnen där denna testmetod anses vara lämpligare än exponeringstest i vatten.

— Fiskens vikt bör mätas så att BCF_k kan korrigeras för utspädning på grund av tillväxt.

Innan man påbörjar något av bioackumuleringstesterna ska följande information om det undersökta ämnet finnas tillgänglig:

(a) Analysteknikens känslighet för att mäta vävnader och vattenbaserade koncentrationer eller foderkoncentrationer för både testämnet och eventuella metaboliter (jfr punkt 65).

(b) Löslighet i vatten [TM A.6, (2)]: detta bör bestämmas enligt en metod som är lämplig för (det uppskattade) löslighetsintervallet för att erhålla ett tillförlitligt värde. För hydrofoba ämnen brukar kolonnelueringsmetoden vara lämpligast.

([1]) Se tillägg 1 för definitioner och enheter.

▼M7

(c) Fördelningskoefficient oktanol/vatten, K_{OW} ([1]) [testmetoderna A.8 (4), A.24 (5), A.23 (6)] eller annan lämplig information om fördelningsbeteende (t.ex. bindning till fett, K_{OC}). Detta bör bestämmas enligt en metod som är lämplig för (det uppskattade) intervallet för K_{OW} för att erhålla ett tillförlitligt värde. För hydrofoba ämnen brukar metoden med långsam omrörning vara lämpligast [TM A.23 (6)].

(d) Ämnets stabilitet i vatten (hydrolys [TM C.7 (7)].

(e) Ämnets stabilitet i foder (särskilt om ett test med exponering via föda väljs).

(f) Information om fotolys i vatten som är relevant för testets bestrålningsbetingelser (8).

(g) Ytspänning (dvs. för ämnen där log K_{OW} inte kan fastställas) [TM A.5 (9).

(h) Ångtryck [TM A.4 (10)].

(i) Eventuell information om biotisk eller abiotisk nedbrytning i vatten, såsom (men inte begränsat till) biologisk nedbrytbarhet [TM C.4 delarna II–VII (11), C.29 (12)], i förekommande fall.

(j) Information om metaboliter: struktur, log K_{OW}, bildning och nedbrytbarhet, i förekommande fall.

(k) Dissociationskonstant (pK_a) för ämnen som kan joniseras. Vid behov bör pH i testvattnet justeras för att se till att den joniserade formen av ämnet i testet är kompatibel med fiskarterna.

Oavsett vald exponeringsmetod eller provtagningssystem beskriver denna testmetod ett förfarande för karakterisering av ämnens bioackumuleringspotential i fisk. Även om genomflödesprov är att föredra, kan semistatiska metoder tillåtas, förutsatt att giltighetskriterierna (jfr punkterna 24 och 113) uppfylls. Vid exponering via föda är genomflödessystemet inte nödvändigt för att upprätthålla det testade ämnets vattenkoncentrationer, men bidrar till att upprätthålla lämpliga koncentrationer löst syre. Genomflödessystemet säkerställer också att vattnet är rent och att effekter av t.ex. avföringsprodukter elimineras.

Oavsett vilken testmetod som väljs ges tillräckliga upplysningar för genomförandet av provet i testmetoden, samtidigt som den ger lämplig frihet för experimentell utformning av förhållandena i vissa laboratorier och varierande karakteristik för de undersökta ämnena. Exponeringstestet via vatten används lämpligen för stabila organiska ämnen med log K_{OW}-värden mellan 1,5 och 6,0 (13), men kan även tillämpas på starka hydrofoba ämnen (med log $K_{OW} > 6,0$) om en stabil och fullständigt upplöst koncentration av testämnet i vatten kan visas. Om en stabil koncentration av testämnet i vatten inte kan visas är en vattenstudie inte lämplig, och i sådana fall är exponering via föda ett bättre alternativ för att testa ämnet i fisk (tolkningen och användningen av resultat från exponeringstest via föda kan dock bero på tillämpligt regelverk). Förbedömningar av biokoncentrationsfaktorn (BCF, även benämnd K_B) för organiska ämnen med värden för log K_{OW} upp till ungefär 9,0 kan fås med den ekvation som tagits fram av Bintein m.fl. (14). Förbedömningen av biokoncentrationsfaktorn för sådana starkt hydrofoba ämnen

([1]) Benämns ibland P_{OW}: bestäms genom en metod med skakning av kolv enligt TM A.8 (4), genom en HPLC-metod enligt TM A.24 (5) och genom en metod med långsam omrörning enligt TM A.23 (6). Ibland används generator-kolonn-tekniken för bestämning av log K_{OW}. Det finns endast ett begränsat antal undersökningar som använder denna teknik, främst för klorerade bifenyler och dibensodioxiner (t.ex. Li och Doucette, 1993) (3). För ämnen som kan joniseras bör log K_{OW} avse den joniserade formen.

▼M7

kan vara högre än den biokoncentrationsfaktor vid stabilt tillstånd (BCF_{SS}) som kan förväntas fås vid laboratorieförsök, särskilt om en enkel linjär modell används för förbedömningen. Parametrar som karakteriserar bioackumuleringspotentialen är bland annat upptagningskonstanten (k_1), förlustkonstanter, inklusive utsöndringskonstanten (k_2), biokoncentrationsfaktorn vid stabilt tillstånd (BCF_{SS}), kinetisk biokoncentrationsfaktor (BCF_K) och biomagnifikationsfaktor för exponering via föda (BMF) ([1]).

Radioaktiv märkning av de ämnen som ska undersökas kan underlätta analysen av vatten-, foder- och fiskprover och kan användas för att fastställa om identifiering och kvantifiering av metaboliter kommer att krävas. Om den totala radioaktiva resten mäts för sig (t.ex. genom förbränning eller vävnadsupplösning), grundas BCF eller BMF på totalvärdet för huvudblandningen, eventuella kvarvarande metaboliter och assimilerat kol. BCF- eller BMF-värden grundade på de totala radioaktiva resterna kan därför inte jämföras direkt med ett BCF eller BMF från specifika analyser av enbart huvudämnet. Separationsprocedurer som TLC, HPLC eller GC ([2]) kan användas före analys i undersökningar av radioaktivt märkta testämnen för att bestämma BCF eller BMF baserat på modersubstansen. Om separationstekniker tillämpas bör modersubstansen och relevanta metaboliter identifieras och kvantifieras ([3]) (jfr punkt 65) om BCF eller BMF ska baseras på huvudämnets koncentration i fisk och inte på totala rester av radioaktivt märkta testämnen. Det är också möjligt att kombinera en fiskmetabolismundersökning eller en undersökning av distribution in vivo med en bioackumuleringsundersökning genom analys och identifiering av vävnadsrester. Möjligheten till metabolism kan förutsägas med lämpliga verktyg (t.ex. OECD QSAR:s verktygslåda (15) och patentskyddade QSAR-program).

Beslutet om huruvida ett exponeringstest via vatten eller föda ska användas, och i vilken utformning, bör baseras på faktorerna i punkt 3 samt relevant regelverk. För ämnen som har hög log K_{OW} men fortfarande visar en uppskattbar vattenlöslighet i förhållande till känsligheten hos tillgängliga analystekniker bör t.ex. exponeringstest via vatten övervägas i första hand. Informationen om vattenlöslighet är dock inte alltid definitiv för dessa hydrofoba typer av ämnen, och därför bör man överväga möjligheten att bereda stabila mätbara upplösta vattenkoncentrationer (stabila emulsioner är inte tillåtna) för en undersökning av exponering via vatten innan man fattar beslut om vilken testmetod som ska användas (16). Det är inte möjligt att ge exakt föreskrivande vägledning om vilken metod som bör användas baserat på brytpunktskriterier för vattenlöslighet och fördelningskoefficienten oktanol/vatten, eftersom andra faktorer (analystekniker, nedbrytning, adsorption osv.) kan ha ett stort inflytande över metodens tillämplighet av de skäl som anges ovan. En log K_{OW} över 5 och en vattenlöslighet under ~0,01–0,1 mg/l är dock en indikation på vilken typ av ämnen som kan vara svårare att testa med exponering via vatten.

Andra faktorer som kan påverka valet av testmetod bör övervägas, bland annat ämnets adsorptionspotential i fråga om testkärl och apparater, ämnets stabilitet i vattenlösningar jämfört med stabiliteten i fiskfoder (17) (18), osv.

Information om sådana praktiska aspekter kan finnas i andra slutförda vattenundersökningar. Närmare information om utvärdering av aspekter kring utförandet av bioackumuleringsstudier finns i litteraturen (t.ex. (19)).

För ämnen vars upplösningsförmåga eller upprätthållandet av vattenkoncentrationen samt analysen av dessa koncentrationer inte hindrar genomförandet av en metod för exponering via vatten är denna metod att föredra för att bestämma ämnets biokoncentrationspotential. I alla händelser bör man kontrollera att de vattenexponeringskoncentrationer som ska användas håller sig inom testmediets

([1]) Se tillägg 1 för definitioner och enheter.
([2]) TLC: tunnskiktskromatografi, HPLC: vätskekromatografi och GC: gaskromatografi.
([3]) Enligt vissa regelverk kan analysen av metaboliter vara obligatoriska om vissa villkor är uppfyllda (jfr punkt 65).

▼M7

upplösningsförmåga i vatten. Olika metoder för att upprätthålla stabila koncentrationer av det upplösta testämnet kan användas, såsom stamlösningar eller passiva doseringssystem (t.ex. kolonnelueringsmetoden), så länge som det kan visas att stabila koncentrationer kan upprätthållas och testmedierna inte ändras jämfört med det testmedium som rekommenderas i punkt 27.

Starkt hydrofoba ämnen (log K_{OW} > 5 och en löslighet under ~ 0,01-0,1 mg/l) kan vara svårare att testa via vattenexponering. Orsaker till begränsningar kan vara att vattenkoncentrationen inte kan upprätthållas på en nivå som anses vara tillräckligt konstant (t.ex. på grund av sorption till glaset på exponeringskärl eller snabbt upptag hos fisken) eller att de vattenkoncentrationer som ska användas är så låga att de ligger inom samma intervall som eller under den analytiska kvantifieringsgränsen ([1]). För dessa starkt hydrofoba ämnen rekommenderas test med exponering via föda, under förutsättning att testet överensstämmer med det tillämpliga regelverket och behov i samband med riskbedömningar.

För ytaktiva ämnen bör man överväga om biokoncentrationstestet är genomförbart med tanke på ämnets egenskaper. Annars är förmodligen test med exponering via föda lämpligare. Ytaktiva ämnen sänker gränsytespänningen mellan två vätskor. Deras amfifila natur (dvs. de innehåller både en hydrofil och en hydrofob) får dem att ansamlas vid gränsytor, t.ex. gränssnittet mellan vatten och luft och mellan foder och vatten samt på glasväggar, vilket försvårar bestämningen av deras vattenkoncentration.

Genom test med exponering via föda kan man kringgå vissa av exponeringsaspekterna för komplexa blandningar som innehåller komponenter med olika vattenlöslighetsgränser, eftersom det är mer sannolikt att en jämförbar exponering för alla komponenter i blandningen uppnås i test med exponering via föda än med exponering via vatten(jfr (20)).

Det bör noteras att test med exponering via föda ger en biomagnifikationsfaktor (BMF), inte en biokoncentrationsfaktor (BCF) ([2]). Det finns metoder för att uppskatta en kinetisk biokoncentrationsfaktor (BCF_K) från de data som genereras i test med exponering via föda, vilket diskuteras i tillägg 8. Dessa metoder bör dock användas med försiktighet. Dessa metoder förutsätter i regel första ordningens kinetik och är endast tillämpliga på vissa grupper av föreningar. Det är osannolikt att sådana metoder kan användas för ytaktiva ämnen (se punkt 12).

Ett minimerat vattenexponeringstest med färre provtagningspunkter för att minska antalet djur och/eller resurser (se punkt 83 ff.) bör endast användas för dessa ämnen om det finns anledning att förutsätta att upptagningen och utsöndringen ungefär kommer att följa första ordningens kinetik (dvs. generellt icke-joniserade ämnen, jfr punkt 88).

C.13 – I: **TEST AV BIOKONCENTRATION I FISK VID EXPONERING VIA VATTEN**

TESTPRINCIP

Testet består av två faser: exponeringsfasen (upptagningsfasen) och post-exponeringsfasen (utsöndringsfasen). Under upptagningsfasen exponeras en grupp av fiskar av en art för testämnet vid en eller flera valda koncentrationer beroende på testämnets egenskaper (jfr punkt 49). Fiskarna överförs därefter till ett medium fritt från det undersökta ämnet för utsöndringsfasen. Utsöndringsfas krävs alltid

([1]) Uppmätta koncentrationer i vatten under upptagningsfasen bör helst vara över kvantifieringsgränsen så att mer än en halveringstid av kroppsbelastningen kan mätas i undersökningens utsöndringsfas.

([2]) Se tillägg 1 för definitioner och enheter.

▼M7

med mindre ämnesupptagningen under upptagningsfasen varit obetydlig. Koncentrationen av det undersökta ämnet i/på fisken eller specificerad vävnad därav ska följas under de bägge provningsfaserna. Utöver den exponerade gruppen ska en kontrollgrupp fiskar hållas under identiska förhållanden, förutom frånvaron av det undersökta ämnet, för att kunna jämföra eventuella negativa effekter i biokoncentrationsprovet mot en jämförbar kontrollgrupp och för att få bakgrundskoncentrationen av det undersökta ämnet ([1]).

För vattenexponeringstestet brukar upptagningsfasen vara 28 dagar. Varaktigheten kan förlängas vid behov (jfr punkt 18) eller förkortas om det kan bevisas att stabilt tillstånd har uppnåtts tidigare (se tillägg 1, definitioner och enheter). Beräkning av upptagningsfasens längd fram till stabilitet kan göras med den ekvation som visas i tillägg 5. Utsöndringsperioden inleds när fisken inte längre exponeras för testämnet, genom överföring av fisken till samma medium, men utan det undersökta ämnet, i ett rent kärl. När så är möjligt ska biokoncentrationsfaktorn beräknas helst både som koncentrationsförhållandet i fisken (C_f) och i vattnet (C_w) vid stabilitet (BCF_{SS}, se definition tillägg 1) och som en kinetisk biokoncentrationsfaktor (BCF_K, se definitioner och enheter i tillägg 1) som uppskattas som förhållandet mellan upptagningskonstanten (k1) och utsöndringskonstanten (k2), varvid första ordningens kinetik ska förutsättas ([2]).

Om stabilt tillstånd inte uppnås inom 28 dagar beräknar man antingen BCF med hjälp av den kinetiska metoden (jfr punkt 38) eller förlänger upptagningsfasen. Om detta leder till en opraktiskt lång upptagningsfas för att nå stabilt tillstånd (jfr 37 och 38, tillägg 5) är den kinetiska metoden att föredra. Alternativt bör ett test med exponering via föda övervägas för starkt hydrofoba ämnen ([3]), under förutsättning att testet med exponering via föda överensstämmer med det tillämpliga regelverket.

Konstanten för upptagningshastigheten, konstanten för utsöndringshastigheten (eller konstanterna om mer komplexa modeller används), biokoncentrationsfaktorn (stabilt tillstånd och/eller kinetik) och när så är möjligt tillförlitlighetsgränserna för var och en av dessa parametrar beräknas med den modell som bäst beskriver den uppmätta koncentrationen av det undersökta ämnet i fisken och vattnet (jfr tillägg 5).

Ökningen av fiskmassa under testet kommer att leda till en minskning av testämnets koncentration i växande fisk (så kallad utspädning på grund av tillväxt), och den kinetiska BCF kommer att underskattas om den inte korrigeras för tillväxt (jfr punkterna 72 och 73).

BCF baseras på total koncentration i fisken (d.v.s. per fiskens totala våtvikt). I specialfall kan emellertid specificerade vävnader eller organ, som t.ex. muskler, lever osv. användas, om fisken är tillräckligt stor eller den kan delas upp i ätbara (filé) och icke ätbara (inälvor) delar. Eftersom det för många organiska ämnen föreligger ett klart samband mellan potentialen för biokoncentration och hydrofobicitet, finns det också ett motsvarande förhållande för fettinnehållet i den undersökta fisken och den observerade biokoncentrationen av sådana ämnen. För att minska denna källa till variationer i provningsresultaten för ämnen med

([1]) De flesta testämnen bör helst inte orsaka detektion i kontrollvattnet. Bakgrundskoncentrationerna bör endast vara relevanta för naturligt förekommande material (t.ex. vissa metaller) och ämnen som finns överallt i miljön.

([2]) Om det är uppenbart att första ordningens kinetik inte följs ska mer komplexa modeller tillämpas (se litteraturhänvisningar i tillägg 5) och råd inhämtas från biostatistiker.

([3]) Upptagningen kan begränsas av koncentrationer med låg exponering på grund av dålig upplösningsförmåga i vatten i biokoncentrationstestet, medan mycket högre exponeringskoncentrationer kan uppnås med kosttestet.

▼M7

hög fettupptagningsförmåga, dvs. med log K_{OW} > 3, bör därför biokoncentrationen uttryckas som normaliserad för fisk med 5 % fetthalt (baserat på hela kroppsvåtvikten) förutom det värde som härleds direkt från undersökningen. Detta är nödvändigt för att skapa ett underlag för att jämföra resultat för olika ämnen och/eller testarter mot varandra. Siffran 5 % fetthalt är vedertagen, eftersom den motsvarar den genomsnittliga fetthalten för de fiskarter som vanligen används i denna testmetod (21).

INFORMATION OM TESTÄMNET

Förutom de egenskaper hos testämnet som anges i inledningen (punkt 3) behövs information om toxiciteten för de fiskarter som ska användas i testet, företrädesvis asymptotisk LC_{50} (dvs. tidsberoende) och/eller toxicitet som uppskattats i långvariga fisktester (t.ex. TM C.47 (22), C.15 (23), C.14 (24)).

Det bör finnas tillgång till en lämplig analysmetod med känd noggrannhet, precision och känslighet för fastställande av mängden undersökt ämne i provlösningar och biologisk materia, tillsammans med uppgifter om beredning och förvaring av proverna. Den analytiska kvantifieringsgränsen för det undersökta ämnet ska också vara känd för både vatten och fiskvävnad. När radioaktivt märkta testämnen används ska de vara av högsta renhet (t.ex. företrädesvis > 98 %) och procentandelen radioaktivitet kopplad till föroreningar bör vara känd.

TESTETS GILTIGHET

För att ett test ska vara giltigt måste följande villkor uppfyllas:

Vattentemperaturvariationen ska vara mindre än ± 2 °C, eftersom stora avvikelser kan påverka de biologiska parametrar som är relevanta för upptagning och utsöndring och dessutom skapa stress hos djuren.

Koncentrationen löst syre får inte falla under en mättnad på 60 %.

Koncentrationen av det undersökta ämnet i kärlen ska hållas inom ± 20 % av det medelvärde som mäts under upptagningsfasen.

Koncentrationen av testämnet ska vara lägre än dess löslighet i vatten, eftersom testvattnet påverka ämnet så att det inte löses upp ordentligt ([1]).

Dödligheten eller andra negativa effekter/sjukdomar i både kontroll- och behandlingsgrupperna ska vara mindre än 10 % vid slutet av testet. Om testet förlängs över flera veckor eller månader ska dödligheten eller andra negativa effekter i bägge fiskgrupperna vara mindre än 5 % per månad och får inte överstiga 30 % totalt. Signifikanta skillnader i den genomsnittliga tillväxten mellan test- och kontrollgrupperna kan vara en indikation på testämnets toxiska effekt.

REFERENSÄMNEN

Användning av referensblandningar med känd biokoncentrationspotential och låg metabolism kan vara lämpligt vid kontroll av experimentförfarandet när så krävs (t.ex. om laboratoriet inte har tidigare erfarenhet av testet eller försöksbetingelserna har ändrats).

([1]) För multikomponentämnen, UVCB och blandningar bör vattenlösligheten för varje relevant komponent övervägas för att avgöra lämpliga exponeringskoncentrationer.

▼M7

BESKRIVNING AV TESTMETODEN

Utrustning

Material som kan lösas upp, absorberas eller läcka och som har negativ effekt på fisken ska nogsamt undvikas i alla delar av utrustningen. Vanliga rektangulära eller cylindriska tankar, tillverkade av kemiskt beständigt material och med lämplig kapacitet vad gäller fyllningshastigheten (jfr punkt 43) kan användas. Användning av mjuka plaströr bör minimeras. Polytetrafluoretylen, rostfritt stål och/eller glasrör bör användas. Erfarenheter visar att kiselglas kan krävas för testämnen med hög absorptionskoefficient, som t.ex. syntetiska pyretroider. I dessa fall bör utrustningen kasseras efter användningen. Testsystemen bör exponeras för koncentrationer av det testämne som ska användas i undersökningen under så lång tid som krävs för att visa att stabila exponeringskoncentrationer kan upprätthållas innan testorganismerna inbegrips.

Vatten

Naturligt vatten används vanligtvis vid undersökningen och bör tas från en oförorenad källa med jämn kvalitet. Rekonstituerat vatten (dvs. avmineraliserat vatten med specifika näringsämnen tillsatta i kända mängder) kan dock vara lämpligare för att säkerställa enhetlig kvalitet över tiden. Lösningsvattnet, som är det vatten som blandas med testämnet innan det hälls in i testkärlet (jfr punkt 30) måste hålla en kvalitet som möjliggör överlevnad för valda fiskarter under acklimatiserings- och provningsperioderna, utan att fiskarna uppvisar onormala förändringar eller beteende. I idealfallet ska det kunna visas att de arter som används kan överleva, växa och reproducera sig i vattenlösningen, t.ex. vid laboratorieodling eller en giftundersökning under livscykeln. Spädvattnet ska bestämmas avseende pH, hårdhet, partikelförekomst, total mängd organiskt kol (TOC ([1])) och helst även ammonium, nitrit och alkalitet, samt för havslevande arter även salthalt. De parametrar som är viktiga för fiskens optimala välstånd är inte fullt kända, men i tillägg 2 anges rekommenderade maximala koncentrationer för ett antal parametrar för söt- och havsvattenprover.

Utspädningsvattnet ska hålla jämn kvalitet under hela testet. pH-värdet ska ligga mellan 6,0 och 8,5 vid teststarten, men under pågående provning ska det ligga inom ± 0,5 enheter. För att säkerställa att vattnet inte påverkar undersökningsresultatet på oönskat sätt, t.ex. genom förändring av det undersökta ämnet, eller negativt påverkar fiskbeståndets förutsättningar, ska prover tas med jämna mellanrum för analys, åtminstone i början och slutet av testet. Bestämning av tungmetaller (t.ex. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd och Ni), viktiga anjoner och katjoner (t.ex. Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-} och SO_4^{2-}), bekämpningsmedel (t.ex. total mängd organiska fosforföreningar eller total mängd organiska klorföreningar), halten organiskt kol och uppslammade partiklar bör utföras t.ex. var tredje månad i fall där man vet att utspädningsvattnet håller en relativt jämn kvalitet. Om utspädningsvattnets kvalitet har visat sig vara jämn under minst ett år kan dessa kontroller göras med längre intervaller (t.ex. var sjätte månad).

Den naturliga partikelinnehållet samt den totala mängden organiskt kol i vattenlösningen ska vara så låg som möjligt för undvikande av adsorption av det undersökta ämnet i organisk materia, vilket skulle kunna minska dess biotillgänglighet och leda till en underskattning av BCF. Det maximalt acceptabla värdet är 5 mg/l för partiklar (torr materia som inte passerar ett filter på 0,45 μm) och 2 mg/l för helorganiskt kol (jfr tillägg 2). Utspädningsvattnet ska vid behov filtreras

([1]) TOC inkluderar organiskt kol från partiklar och löst organiskt kol, dvs. TOC = POC + DOC.

▼M7

före användning. Bidraget till innehållet av organiskt kol i testvattnet (exkrementer) från fisk och foderrester ska vara så litet som möjligt. Koncentrationen av organiskt kol i vattnet (exkrementer) från fisk och foderrester ska vara så litet som möjligt (jfr punkt 46).

Testlösningar

Lös upp det undersökta ämnet vid lämplig koncentration för förvaring. Stamlösningen ska helst beredas genom att det undersökta ämnet helt enkelt blandas eller rörs i vattenlösningen. Ett alternativ som kan vara lämpligt i vissa fall är att använda ett doseringssystem med fast fasdesorption. Användningen av lösningsmedel och dispergeringsmedel (lösningsagenter) rekommenderas generellt inte (jfr. (25)), men kan vara godtagbar för att producera en lämpligt koncentrerad stamlösning. Användningen bör dock minimeras så mycket som möjligt, och materialens kritiska micellkoncentration får inte överskridas (i förekommande fall). Lösningsmedel som får användas är etanol, metanol, dimetylformamid och trietylenglykol. Dispergeringsmedel som har använts är Tween 80, metylcellulosa 0,01 % och HCO-40. Lösningsmedelskoncentrationen i det slutliga testmediet bör vara densamma i alla behandlingar (dvs. oavsett testämnets koncentration) och får inte överstiga de motsvarande toxicitetsgränser som fastställts för lösningsmedlet enligt försöksbetingelserna. Högsta nivån är en koncentration på 100 mg/l (eller 0,1 ml/l). Det är osannolikt att en lösningsmedelskoncentration på 100 mg/l kommer att ändra den högsta upplösta koncentrationen av testämnet som kan uppnås i mediet i någon större utsträckning (25). Lösningsämnets bidrag (tillsammans med testämnet) till det totala innehållet av organiskt kol i provningsvattnet ska vara känt. Koncentrationen av totalt organiskt kol i provningskärlet ska under undersökningen inte överstiga den koncentration av organiskt kol som härrör från testämnet, lösningsmedlet eller lösningsagenten ([1]) om sådan används, med mer än 10 mg/l (± 20 %). Det organiska innehållet kan ha en betydande effekt på mängden fritt upplöst testämne under genomflödestest för fisk, särskilt för ämnen med hög fetthalt. Mikroextraktion i fast fas (jfr punkt 60) kan ge viktig information om förhållandet mellan bundna och fritt upplösta föreningar, varav de senare förutsätts utgöra den biotillgängliga fraktionen. Testämneskoncentrationen bör vara lägre än testämnets löslighetsgräns i testmediet, oavsett användning av lösningsmedel eller solubiliseringsmedel. Försiktighet ska iakttas vid användning av lätt biologiskt nedbrytbara lösningsmedel, eftersom dessa kan förorsaka problem med bakterietillväxt vid genomflödesprovning. Om det inte är möjligt att bereda stamlösningen utan solubiliseringsmedel bör man överväga om vattenexponering är ett lämpligt val eller om ett test med exponering via föda skulle vara lämpligare.

Vid genomflödesprovet krävs ett system som kontinuerligt släpper ut och löser upp stamlösningen av det undersökta ämnet (t.ex. med mätpump, proportionalitetslösningssystem eller ett doseringssystem med fast fasdesorption) för att leverera provningskoncentrationerna till provningskärlen. Helst ska minst fem volymsombyten per dag göras i provningskärlen. Genomflödessystemet är att föredra, men när detta inte är genomförbart, t.ex. om den undersökta organismen påverkas negativt därav, kan en semistatisk teknik användas, förutsatt att giltighetskriterierna uppfylls (jfr punkt 24). Stamlösningens och utspädningsvattnets flöden ska kontrolleras både 48 timmar före och minst en gång dagligen under pågående provning, Denna kontroll ska omfatta fastställande av flödeshastigheten genom varje provningskammare, samt skall den garantera att flödeshastigheten inte varierar med mer än 20 % inom eller mellan kärlen.

([1]) Om ett lösningsmedel eller ett solubiliseringsmedel används bör det organiska kol som härrör från agenten läggas till det organiska kolet i testämnet för att bedöma koncentrationen av organiskt kol i testkärlen, men detta rekommenderas inte generellt.

▼M7

Val av art

Viktiga kriterier vid val av arter är att de ska finnas enkelt tillgängliga, kan skaffas i lämpliga storlekar och kan hållas på ett tillfredsställande sätt i laboratoriemiljö. Andra kriterier vid val av fiskart är betydelsen för rekreation, handel och ekologi samt jämförbar känslighet, tidigare framgångsrik användning osv. Rekommenderade testarter anges i tillägg 3. Andra arter kan användas, men provningsförfarandet kan då behöva anpassas för att ge lämpliga provningsförhållanden. I ett sådant fall måste testrapporten innehålla en motivering för valet av art och testmetod. Användning av mindre fiskarter förkortar vanligen tiden fram till stabilt tillstånd, men det kan behövas mer fisk (prover) för en lämplig analys av fetthalten och koncentrationen av testämnet i fisken. Dessutom kan skillnader i andningstakt och metabolism mellan äldre och yngre fiskar försvåra jämförelser av resultaten mellan olika tester och testarter. Det bör noteras att fiskarter som testas under ett stadium med snabb tillväxt (ungfisk) även kan försvåra datatolkningen.

Fiskhållning (relevant för exponering via vatten och föda)

Fiskbeståndet bör acklimatiseras under minst två veckor i vatten (jfr punkt 28) med provningstemperaturen och hela tiden utfodras med tillräckligt foder (jfr punkt 45). Både vatten och foder bör vara av samma typ som de som ska användas under testet.

Efter en anpassningsperiod på 48 timmar ska dödligheten registreras och följande kriterier tillämpas:

— Om mortaliteten under sju dagar är högre än 10 % av beståndet bör hela beståndet förkastas.

— Om mortaliteten ligger mellan 5 % och 10 % av beståndet under sju dagar: fortsätt acklimatiseringen under ytterligare sju dagar. Om mer än 5 % av beståndet har dött under den andra sjudagarsperioden ska hela beståndet förkastas.

— Om mortaliteten under sju dagar är lägre än 5 % av beståndet kan beståndet godtas.

Fisk som används vid undersökningen bör inte ha några synliga sjukdomar eller abnormiteter. Alla döda fiskar rensas bort. Fiskarna bör inte ges behandling mot sjukdomar under de två veckorna före testet eller under testets gång.

TESTFÖRFARANDE

Preliminärt test

Det kan vara lämpligt att göra ett preliminärt försök för att optimera provningsförhållandena för det slutgiltiga testet, t.ex. val av koncentration för det undersökta ämnet och längd på upptagnings- och utsöndringsfaserna, eller för att fastställa om ett fullständigt test måste utföras. Det preliminära testet bör utformas så att det är möjligt att inhämta den information som krävs. Man bör överväga om ett minimerat test är tillräckligt för att härleda BCV eller om det krävs en fullständig undersökning (jfr punkterna 83–95 om minimerade test).

Exponeringsförhållanden

Upptagningsfasens längd

Upptagningsfasens längd kan bedömas utifrån praktiska erfarenheter (t.ex. från tidigare undersökning eller en ackumuleringsstudie av en strukturellt relaterad kemikalie) eller från vissa empiriska förhållanden tillsammans med kunskap om antingen testämnets vattenlöslighet eller fördelningskoeffecient oktanol/vatten (under förutsättning att upptagningen följer första ordningens kinetik (jfr tillägg 5).

▼M7

Upptagningsfasen ska vara 28 dagar om det inte kan visas att stabilt tillstånd nås tidigare (se tillägg 1, definitioner och enheter). Stabilt tillstånd nås när mängden undersökt ämne i fisk (C_f) i den tidpunkt där kurvan blir parallell med tidsaxeln och tre på varandra följande C_f-analyser, på prover tagna med intervaller på minst två dagar, ligger inom ± 20 % på de tre proverna och ingen signifikant ökning av C_f förekommer under tiden mellan den första och den sista successiva analysen. När kombinerade prover analyseras krävs minst fyra på varandra följande analyser. När de undersökta ämnena tas upp långsamt bör provtagningsintervallerna vara sju dagar. Om stabilt tillstånd inte har nåtts efter 28 dagar kan man antingen beräkna BCF endast med den kinetiska metoden, som inte är beroende av huruvida stabilt tillstånd har nåtts, eller förlänga upptagningsfasen och göra ytterligare mätningar till dess stabilt tillstånd nås eller i 60 dagar, beroende av vad som inträffar först. Testämnets koncentration i fisken vid slutet av upptagningsfasen måste också vara tillräckligt hög för att möjliggöra en tillförlitlig uppskattning av k_2 från utsöndringsfasen. Om ingen betydande upptag visas efter 28 dagar kan testet avbrytas.

Utsöndringsfasens varaktighet

För ämne som följer första ordningens kinetik är en period motsvarande halva upptagningsfasen normalt tillräcklig för att få tillräcklig minskning, t.ex. 95 %, av det undersökta ämnet i fiskkroppen (jfr tillägg 5 för förklaring av bedömningen). Om den tid som krävs för att få en 95-procentig minskning blir orimligt lång, dvs. att den överskrider dubbla normala varaktigheten för upptagningsfasen, dvs. mer än 56 dagar, kan en kortare period användas, t.ex. tills koncentrationen av det undersökta ämnet är mindre an 10 % av koncentrationen vid stabilitet. Längre utsöndringsperioder kan dock krävas för ämnen med ett mer komplext mönster för upptagning och utsöndring än det som representeras av en enstaka fiskmodell med första ordningens kinetik. Om sådana komplexa mönster observeras och/eller förväntas bör man dock inhämta råd från biostatistiker och/eller farmakokinetiker för att säkerställa en lämplig testutformning. Eftersom utsöndringsperioden förlängs kan antalet provfiskar begränsas och tillväxtskillnader mellan fisken kan påverka resultaten. Periodens längd kommer även att styras utifrån längden på den period under vilken koncentrationen av testämnet i fiskarna ligger kvar över en analytisk kvantifieringsgräns.

Antal testfiskar

Välj antalet fiskar per undersökt koncentration på ett sådant sätt att minst fyra fiskar finns tillgängliga vid varje provtagningspunkt. Fiskgrupper bör endast slås ihop om det inte är möjligt att analysera enstaka fiskar. Om man vill ha högre precision i kurvanpassning (och härledda parametrar) eller om metabolismundersökningar är nödvändiga (t.ex. för att skilja mellan metaboliter och modersubstanser vid användning av radioaktivt märkta testämnen) behövs fler fiskar per provtagningspunkt. Fettinnehållet ska fastställas för samma biologiska materia som används för fastställande av koncentrationen av testämnet. Om detta inte är möjligt kan fler fiskar behövas (jfr punkterna 56 och 57).

Om vuxna (dvs. könsmogna) fiskar används bör de inte leka eller nyligen ha lekt, varken före eller under testet. Det ska också redovisas om han- eller honfiskar eller bägge används i försöket. Om båda könen används ska det dokumenteras att skillnader i tillväxt och fetthalt mellan könen är inte är signifikanta innan exponeringen inleds, särskilt om det kan bli nödvändigt att slå ihop han- och honfiskar för att säkerställa detekterbara ämneskoncentrationer och/eller fetthalter.

▼M7

Vid denna typ av undersökningar ska fiskar med jämn vikt alltid väljas på ett sådant sätt att den minsta fisken inte väger mindre än 2/3 av vad den största väger. Samtliga fiskar ska vara från samma årskull och från samma källa. Eftersom fiskens vikt och ålder kan ha stor betydelse för BCF-värdena (12), bör dessa uppgifter registreras korrekt. Det rekommenderas att delar av fiskbeståndet vägs kort före det att testet inleds för att fastställa medelvikten (jfr punkt 61).

Fisktäthet

En hög fisktäthet bör användas för att minimera minskningen av koncentrationen av testföreningen i vatten på grund av tillförsel av fiskar vid undersökningens början samt för att undvika en ökning av koncentrationen löst syre. Det är viktigt att fisktätheten är anpassad för den art som används. En täthet på 0,1–1,0 g fisk (våt vikt) per liter vatten och dag rekommenderas normalt. Högre fisktäthet per liter vatten kan användas om det visar sig att önskad koncentration av det undersökta ämnet kan upprätthållas inom ± 20 % och att koncentrationen löst syre inte faller under 60 % mättnad (jfr punkt 24).

Vid val av lämpliga system ska hänsyn tas till fiskartens normala beteende. Bottenlevande fisk kan således kräva en större bottenyta i ett akvarium för en viss vattenvolym jämfört med ytlevande fiskarter.

Utfodring

Under acklimatiserings- och provningsperioderna ska fisken utfodras med lämplig diet med känd fetthalt och totalt proteininnehåll, i sådan utsträckning att de hålls friska och behåller kroppsvikten (en viss tillväxt är tillåten). Under acklimatiserings- och provningsperioderna bör man utfodra fisken dagligen vid en fast nivå beroende på använda arter, försöksbetingelser och fodrets kalorivärde (för regnbåge t.ex. omkring 1–2 % av kroppsvikten per dag). Foderintervallerna bör väljas så att snabb tillväxt och stora ökningar av fetthalten undviks. För att upprätthålla samma foderintervall bör fodermängden omräknas med lämpliga mellanrum, t.ex. en gång i veckan. Vid denna beräkning kan fiskens vikt i respektive provningskammare bedömas utifrån vikten på den fisk som senast tagits som prov från respektive kammare. Väg inte den fisk som lämnas kvar i kammaren.

Kvarvarande foder och exkrementer bör sugas ut från provningskammaren kort efter utfodringen (30 minuter till 1 timme). Kärlen bör hållas så rena som möjligt under testet så att koncentrationen av organiskt material hålls så låg som möjligt (jfr punkt 29), eftersom förekomst av organiskt kol kan begränsa testämnets biotillgänglighet (12).

Eftersom många fodersorter baseras på fiskmjöl bör man se till att fodret inte påverkar testresultaten eller inducerar negativa effekter, t.ex. om de innehåller (spår av) bekämpningsmedel, tungmetaller och/eller själva testämnet.

Ljus och temperatur

Rekommenderad ljusperiod är 12 till 16 timmar, och temperaturen (± 2 °C) ska vara anpassad för testarten (jfr tillägg 3). Belysningens typ och egenskaper ska vara kända. Hänsyn ska tas till det undersökta ämnets eventuella fototransformation under strålningsförhållanden vid försöket. Lämplig belysning ska användas för undvikande av exponering av fisken för onaturliga ljusprodukter. Det kan i vissa fall vara lämpligt att använda ett filter för bortfiltrering av UV-strålning under 290 nm.

▼M7

Testkoncentrationer

Testet utformades ursprungligen för icke-polära organiska ämnen. För denna typ av ämne kan det vara tillräckligt att exponera fisken för en enda koncentration, eftersom inga koncentrationseffekter förväntas. Dock kan två koncentrationer krävas enligt tillämpligt regelverk. Om ämnen utanför detta område testas eller om det finns andra indikationer på eventuellt koncentrationsberoende, bör testet köras med två eller flera koncentrationer. Om bara en koncentration testas bör detta motiveras (jfr punkt 79). Dessutom bör den testade koncentrationen vara så låg som är praktiskt eller tekniskt möjligt (dvs. inte nära löslighetsgränsen).

I vissa fall kan det förväntas att biokoncentrationen av ett ämne är beroende av vattenkoncentrationen (t.ex. för metaller, där upptagning i fisk kan vara åtminstone delvis reglerat). I ett sådant fall måste minst två, men helst fler, miljömässigt relevanta koncentrationer testas (jfr punkt 49). Av praktiska skäl rekommenderas testning vid minst två koncentrationer även för ämnen där de testade koncentrationerna måste vara nära löslighetsgränsen, eftersom detta kan ge insikt i exponeringskoncentrationernas tillförlitlighet. Vid valet av testkoncentrationer bör man beakta den miljömässigt realistiska koncentrationen samt den koncentration som är relevant för syftet med bedömningen.

Koncentrationen eller koncentrationerna av testämnet bör väljas under kronisk effekt eller till ungefär 1 % av dess akuta asymptotiska LC_{50} inom ett miljömässigt relevant intervall och så att den är åtminstone högre än den kvantifieringsgräns som ska överskridas i vatten med den använda analysmetoden. Den högsta tillåtliga provningskoncentrationen kan också fastställas genom division av den akuta LC_{50} under 96 timmar med lämpligt akut/kronisk kvot (lämpliga kvoter för vissa kemikalier är t.ex. omkring 3, men ett fåtal kemikalier är över 100). Om en andra koncentration används bör den avvika från den ovannämnda koncentrationen med en faktor på 10. Om detta inte är möjligt på grund av toxicitetskravet (som begränsar den övre testkoncentrationen) och analysgränsen (som begränsar den lägre testkoncentrationen) kan en lägre faktor än 10 tillämpas och användning av radioaktivt märkta testämnen (av högsta renhet, helst > 98 %) bör övervägas. Det är viktigt att se till att ingen av de använda koncentrationerna ligger över testämnets löslighetsgräns i testmediet.

Kontroller

En utspädningsvattenkontroll eller i förekommande fall (jfr punkterna 30 och 31), en kontroll som innehåller lösningsmedlet ska göras förutom testserierna.

Frekvens för mätningar av vattenkvaliteten

Löst syre, TOC, pH och temperatur ska mätas i samtliga test- och kontrollkärl under testet. Total hårdhet och salthalt (om relevant) bör mätas i kontrollerna och i ett kärl. Om två eller fler koncentrationer testas mäts dessa parametrar vid den högre (eller högsta) koncentrationen. Löst syre och eventuellt salthalt ska mätas minst tre gånger – i början, ungefär i mitten och mot slutet av upptagningsperioden – och en gång i veckan under utsöndringsperioden. TOC ska mätas vid början av provet (24 och 48 timmar innan upptagningsfasen initieras) före det att fisken tillsätts och minst en gång i veckan under både upptagnings- och utsöndringsfaserna. Temperaturen ska mätas och registreras dagligen, pH i början och slutet av varje period och hårdheten en gång under varje provning. Temperaturen ska helst avläsas kontinuerligt i åtminstone ett kärl.

▼M7

Provtagning och analys ar fisk och vatten

Schema för provtagning på fisk och vatten

Prover av vatten från provningskärlen ska tas både före det att fisken tillsätts samt under upptagnings- och utsöndringsfaserna för fastställande av koncentrationen av testämnet. Prover bör tas av vattnet före utfodring, samtidigt som provtagningen av fisken. Tätare provtagningsintervaller kan vara lämpliga för att säkerställa stabila koncentrationer efter tillförseln av fisken. Under upptagningsfasen bör koncentrationen av det undersökta ämnet fastställas för kontroll av överensstämmelse med giltighetskriterierna (punkt 24). Om vattenprovsanalyserna i början av utsöndringsfasen visar att testämnet inte detekteras, kan det vara motiverat att inte mäta test- och kontrollvattnet för testämnet under återstoden av utsöndringsfasen.

Prover bör tas på fisken minst fem gånger under upptagningsfasen och vid minst fyra tillfällen under testämnets utsöndringsfas. Eftersom det i bland är svårt att göra en exakt uppskattning av BCF-värdet grundat på detta antal prover (framför allt när en annan upptagning och utsöndringskinetik än första ordningens kan påvisas), kan det vara tillrådligt att ta prover med tätare mellanrum under bägge perioderna (jfr tillägg 4).

Fettinnehållet ska fastställas för samma biologiska materia som används för fastställande av koncentrationen av testämnet åtminstone i början och slutet av upptagningsfasen och i slutet av utsöndringsfasen. Om detta inte är möjligt bör prover tas på minst tre oberoende fiskar för att fastställa fetthalten vid var och en av de tre tidpunkterna. Fiskantalet per tank i början av försöket bör justeras därefter ([1]). Om inga signifikanta mängder av testämnet detekteras i kontrollfisken (dvs. från stampopulationen) kan kontrollfisken från testet analyseras endast för fetthalt, och testämnesanalysen i testgrupperna (samt relaterade upptagnings- och utsöndringskonstanter samt BCF-färden) kan korrigeras för ändringar enligt kontrollgruppens fetthalt under testet ([2]).

Analyser av testämnet och fetthalt ska inte göras av döda eller sjuka fiskar.

I tillägg 4 ges ett exempel på ett acceptabelt provtagningsschema. Andra scheman kan lätt räknas ut med andra antagna värden för K_{OW}, för beräkning av exponeringstiden för att få 95-procentig upptagning (se tillägg 5 för beräkningar).

Provtagningen ska fortsätta under upptagningsfasen tills stabilt tillstånd har uppnåtts (se tillägg 1, definitioner och enheter) eller tills upptagningsfasen har avslutats (efter 28 eller 60 dagar, jfr punkterna 37 och 38). Innan utsöndringsfasen inleds bör fisken flyttas över till rena kärl.

Provtagning och provberedning

Vattenprover bör tas för analys, t.ex. genom en tät röranslutning i provningskammarens mittpunkt. Den icke-biotillgängliga fraktionen av testämnet kan inte alltid separeras från den biotillgängliga fraktionen genom centrifugering eller filtrering. Om en separationsteknik används ska en motivering till eller validering av tekniken alltid anges i testrapporten på grund av svårigheterna med biotillgänglighet (25). Särskilt när det gäller hydrofoba ämnen (ämnen med log K_{OW} > 5) (12) (26), där adsorption till filtermatrisen eller centrifugeringskärlen kan förekomma, bör proverna inte genomgå sådana behandlingar. Åtgärder bör i stället

([1]) Om fetthalten inte analyseras hos samma fiskar som testämnet bör fisken åtminstone vara av liknande vikt och (i förekommande fall) kön.

([2]) Detta alternativ får endast användas om antalet fiskar i alla testgrupper är ungefär lika och fisken avlägsnas enligt samma mönster och utfodras på samma sätt. Detta säkerställer att fiskens tillväxt i alla testgrupper är liknande, om den testade koncentrationen ligger under toxicitetsintervallet. Om tillväxten är liknande förväntas även fetthalten vara liknande. En annorlunda tillväxt i kontrollgruppen skulle visa på en ämneseffekt och då blir undersökningen ogiltig.

▼M7

vidtas för att hålla tankarna så rena som möjligt (jfr punkt 46) och innehållet fullorganiskt kol ska övervakas under både upptagnings- och utsöndringsfasen (jfr punkt 53). För att undvika eventuella problem med minskad biotillgänglighet kan provtagning med mikroextraktion i fast fas tillämpas för svårlösliga och mycket hydrofoba ämnen.

Provtagningsfisken bör avlivas omedelbart med en lämplig och human metod (för hela fiskmätningar bör inga andra processer än sköljning med vatten (jfr punkt 28) och torrtorkning av fisken utföras). Väg fisken och mät den totala längden ([1]). Uppmätt vikt och längd för varje enskild fisk kopplas till den analyserade ämneskoncentrationen (och fetthalten i förekommande fall), t.ex. genom användning av en unik identifieringskod för varje fisk.

Det är lämpligt att under den tid som provet pågår analysera fisken och vattnet omedelbart efter provtagning, för att förhindra försämring eller andra förluster samt för beräkning av ungefärlig upptagnings- och utsöndringshastighetkonstanter. Mellananalyser förhindrar också förseningar när det gäller fastställandet av när platån (stabilt tillstånd) har uppnåtts.

Om mellananalyser inte görs ska proverna förvaras med en lämplig metod. Innan undersökningen påbörjas bör man inhämta information om lämplig förvaringsmetod för det aktuella ämnet, t.ex. djupfrysning, nedkylning vid 4 °C, extraktion osv. Lagringsperioden bör väljas så att ämnet inte försämras under lagringen.

Analysmetodens kvalitet

Eftersom hela proceduren i huvudsak styrs av noggrannhet, precision och känslighet i den analysmetod som används för det undersökta ämnet, ska noggrannhet, precision och reproducerbarhet för ämnesanalysen kontrolleras experimentellt, vilket även gäller för återhämtning av det undersökta ämnet från både vatten och fisk, vilket ska vara tillfredsställande med den aktuella metoden. Detta bör ingå i de preliminära testerna. Kontrollera också att det undersökta ämnet inte kan upptäckas i det utspädningsvatten som används. Vid behov bör de värden för testämneskoncentrationen i vatten och fisk som erhållits från testet korrigeras för återhämtning och bakgrundsvärden i kontrollerna. Fisk- och vattenprover bör alltigenom hanteras på ett sådant sätt att förorening och förlust minimeras, t.ex. på grund av adsorption från provtagningsanordningarna.

Analys av fiskprov

Om radioaktivt märkt material används vid undersökningen är det möjligt att analysera den totala radioaktiva märkningen, dvs. moderblandning och metaboliter, eller kan proverna rengöras så att moderämnet kan analyseras separat. Om BCF ska baseras på modersubstansen bör de större metaboliterna karakteriseras, som ett minimum i slutet av upptagningsfasen (jfr punkt 6). Större metaboliter är metaboliter som utgör ≥ 10 % av de totala resterna i fiskvävnaden, metaboliter som utgör ≥ 5 % vid två provtagningspunkter i rad, metaboliter som visar ökande nivåer under upptagningsfasen och metaboliter med känd toxikologisk risk. Om BCF för hela fisken räknat i totala radioaktivt märkta rester är ≥ 500 kan det vara tillrådligt att identifiera och kvantifiera större metaboliter. För vissa kategorier av

([1]) Förutom vikt bör totallängd registreras, eftersom jämförelser av längdökningar under testperioden är en bra indikator på huruvida en negativ effekt har uppstått.

▼M7

ämnen som bekämpningsmedel rekommenderas det starkt. Kvantifiering av sådana metaboliter kan vara ett krav från vissa tillsynsmyndigheter. Om rester som representerar ≥ 10 % av den totala radioaktivt märkta resten i fiskvävnaden identifieras och kvantifieras, är det också rekommendabelt att identifiera och mängdbestämma resterna i provningsvattnet. Om detta inte är möjligt ska en förklaring lämnas i rapporten.

Koncentrationen av det undersökta ämnet ska normalt fastställas för varje vägd fiskindivid. Om detta inte är möjligt kan man slå ihop proven för varje provtagningstillfälle. Sammanslagning begränsar dock urvalet av statistiska metoder för uppgifterna och därför bör testet i sådana fall omfatta tillräckligt många fiskar för att tillgodose behoven i fråga om sammanslagning, statistisk metod och statistisk kraft. Litteraturhänvisningarna (27) och (28) kan användas som en introduktion till relevanta sammanslagningsprocedurer.

BCF bör uttryckas som normaliserat för fisk med en fetthalt på 5 % (baserat på våtvikt), förutom den fetthalt som härletts direkt från undersökningen (jfr punkt 21), om det inte kan hävdas att testämnet inte primärt ackumuleras i lipider. Fiskens fetthalt ska om möjligt bestämmas vid varje provtagningstillfälle, helst på samma extrakt som det som tagits fram för analys av det undersökta ämnet, eftersom fettet ofta måste tas bort från extraktet innan kromatografisk analys kan göras. Analysen av testämnena kräver dock ofta specifika extraktionsprocedurer som kan strida mot testmetoderna för bestämning av fetthalt. I ett sådant fall (fram till dess att icke-destruktiva instrumentmetoder finns tillgängliga) bör en annan strategi tillämpas för bestämning av fetthalten (jfr punkt 56). Lämpliga metoder ska användas för fastställandet av fettinnehållet (20). Kloroform-/metanolextraktionstekniken (29) kan rekommenderas som standardmetod (30), men Smedes-metoden (31) rekommenderas som en alternativ teknik. Smedes-metodens effektivitet är jämförbar vad gäller extraktionsförmåga, den har hög noggrannhet, använder mindre toxiska lösningsmedel och är lättanvänd. Andra metoder vars noggrannhet kan jämföras med de rekommenderade metoderna kan användas med vederbörlig motivering. Det är viktigt att lämna uppgifter om den metod som använts.

Mätning av fiskens tillväxt

När testet inleds vägs fem till tio enskilda fiskar från stampopulationen och deras totallängd mäts. Man kan använda samma fisk som för fettanalysen (jfr punkt 56). Vid varje provtagningstillfälle ska använd fisk från både test- och kontrollgrupperna vägas och mätas innan den kemiska analysen eller fettanalysen utförs. Mätningarna av dessa provtagningsfiskar kan användas för att uppskatta vikt och längd för den fisk som är kvar i testet och kontrolltankarna (jfr punkt 45).

DATA OCH RAPPORTERING

Behandling av resultaten

Upptagningskurvan för det undersökta ämnet bör fås genom avsättning av dess koncentration i/på fisk (eller specificerad vävnad därav) under upptagningsfasen i förhållande till tiden på aritmetisk skala. Om kurvan når en platå, dvs. blir ungefär asymptotisk med tidsaxeln, beräknas BCF för stabilt tillstånd (BCF_{ss}) med följande formel:

$$\frac{C_f \text{ vid stabilt tillstånd} (\text{medelvärde})}{C_w \text{ vid stabilt tillstånd} (\text{medelvärde})}$$

▼M7

Utvecklingen av C_f kan påverkas av fiskens tillväxt (jfr punkterna 72 och 73). Medelvärdet för exponeringskoncentrationen (C_w) påverkas av variationer över tiden. Det kan förväntas att en tidsviktad genomsnittlig koncentration är mer relevant och precis för bioackumuleringsundersökningar, även om variationen håller sig inom ett lämpligt validitetsintervall (jfr punkt 24). Ett tidsviktat genomsnitt (TWA) för vattenkoncentrationen kan beräknas enligt tillägg 5, avsnitt 1.

Den kinetiska biokoncentrationsfaktorn (BCF_K) ska bestämmas som förhållandet k_1/k_2, de två hastighetskonstanterna enligt den första ordningens kinetik. Konstanterna k_1 och k_2 samt BCF_K kan härledas genom samtidiga upptagnings- och utsöndringsfaser. Alternativt kan k_1 och k_2 bestämmas stegvis (se tillägg 5 för en beskrivning och jämförelse av dessa metoder). Utsöndringskonstanten (k_2) kan behöva korrigeras för utspädning på grund av tillväxt (se punkterna 72 och 73). Om det är uppenbart att upptagnings- och/eller utsöndringskurvan inte är en kurva av första ordningen, ska mer komplexa modeller tillämpas (se litteraturhänvisningar i tillägg 5) och råd inhämtas från biostatistiker och/eller farmakokinetiker.

Uppgifter om fiskens vikt/längd

Våtvikt för enskilda fiskar och totala längder för alla provtagningsintervall anges i separata tabeller för test- och kontrollgrupperna under upptagningsfasen (inklusive stampopulationen för upptagningsfasens start) och utsöndringsfasen. Uppmätt vikt och längd för varje enskild fisk kopplas till den analyserade kemikaliekoncentrationen, t.ex. genom användning av en unik identifieringskod för varje fisk. Vikt är det lämpligaste tillväxtmåttet för att korrigera kinetiska BCF-värden för utspädning på grund av tillväxt (den metod som används för att korrigera data för utspädning på grund av tillväxt beskrivs i punkt 73 och tillägg 5).

Korrigering för utspädning på grund av tillväxt och fettnormalisering

Fiskens tillväxt under utsöndringsfasen kan sänka de uppmätta kemikaliska koncentrationerna i fisken, vilket leder till att den totala utsöndringskonstanten (k_2) är högre än den skulle vara på grund av enbart elimineringsprocesser (t.ex. andning, metabolism, egestion). Kinetiska biokoncentrationsfaktorer bör därför korrigeras för utspädning på grund av tillväxt. BCF_{SS} påverkas också av tillväxt, men det finns inget vedertaget förfarande för att korrigera BCF_{SS} för tillväxt. Om tillväxten är signifikant bör även BCF_K, korrigerad för tillväxt (BCF_{Kg}), härledas eftersom detta kan vara ett mer relevant mått för biokoncentrationsfaktorn. Testfiskens fetthalt (som har ett starkt samband med bioackumulering av hydrofoba ämnen) kan variera så mycket i praktiken att det krävs en normalisering för att man ska kunna bestämma fiskens fetthalt (5 viktprocent) och presentera både kinetiska och stabila biokoncentrationsfaktorer på ett meningsfullt sätt, om det inte kan hävdas att testämnet inte primärt ackumuleras i fettet (vissa perfluorerade ämnen kan t.ex. bindas till proteiner). Ekvationer och exempel på sådana beräkningar finns i tillägg 5.

För att korrigera en kinetisk BCF för utspädning på grund av tillväxt måste utsöndringskonstanten korrigeras för tillväxt. Den tillväxtkorrigerade utsöndringskonstanten(k_{2g}) beräknas genom att tillväxtkonstanten (k_g, erhålls från data om uppmätt vikt) dras av från den totala utsöndringskonstanten (k_2). Därefter beräknas den tillväxtkorrigerade kinetiska biokoncentrationsfaktorn genom att upptagningskonstanten (k_1) divideras med den tillväxtkorrigerade utsöndringskonstanten (k_{2g}) (jfr tillägg 5). I vissa fall kan detta tillvägagångssätt vara problematiskt. För ämnen med mycket långsam utsöndring som testas på snabbväxande fisk kan den härledda k_{2g} vara mycket liten, vilket innebär att felet i de två konstanter som

▼M7

används för att få fram detta värde blir kritiskt, och i andra fall kan k_g-uppskattningarna vara större än k_2. Ett alternativt tillvägagångssätt som undviker behovet av korrigering för utspädning på grund av tillväxt är att använda utsöndringsdata för massa av testämne per fisk (hela fiskar) i stället för koncentrationsdata för massa av testämne per enhetsmassa av fisk, vilket är det vanliga. Detta är enkelt att åstadkomma eftersom testerna enligt denna testmetod bör koppla registrerade vävnadskoncentrationer till enskilda fiskars längd. Det enkla förfarandet för att göra detta beskrivs i tillägg 5. Observera att k_2 fortfarande ska rapporteras även om detta alternativa tillvägagångssätt används.

Kinetiska och stabila biokoncentrationsfaktorer bör även redovisas i förhållande till standardvärdet för fetthalt i fisk på 5 viktprocent om det inte kan hävdas att testämnet inte primärt ackumuleras i fettet. Data om koncentrationer i fisk eller BCF normaliseras enligt förhållandet mellan 5 % och den faktiska (individuella) genomsnittliga fetthalten (procentandelen våtvikt) (jfr tillägg 5).

Om kemiska analyser och fettanalyser har gjorts av samma fisk ska normaliserade data om fetthalt för enskilda fiskar användas för att beräkna BCF normaliserad för fetthalt. Om tillväxten hos kontrollfisken och den exponerade fisken är liknande kan endast kontrollfiskens fetthalt alternativt användas för att korrigera fetthalten (jfr punkt 56). En beräkningsmetod för BCF normaliserad för fetthalt beskrivs i tillägg 5.

Tolkning av resultaten

Resultaten ska tolkas med försiktighet när uppmätta koncentrationer av den undersökta lösningen påträffas på nivåer nära den analytiska metodens gränsvärde för detektion.

Den genomsnittliga tillväxten i både test- och kontrollgrupperna ska i princip inte skilja sig nämnvärt för att utesluta toxiska effekter. De två gruppernas tillväxtkonstanter eller tillväxtkurvor bör jämföras med ett lämpligt förfarande ([1]).

Tydligt definierade upptagnings- och utsöndringskurvor är en indikation på att biokoncentrationsdata är av god kvalitet. För konstanterna bör resultatet av ett test av anpassningsgraden (”goodness of fit”) av typen χ^2 visa en god anpassningsgrad (dvs. låg felprocent för mätningen (32)) för bioackumuleringsmodellen för att konstanterna ska anses vara tillförlitliga (jfr tillägg 5). Om fler än en testkoncentration används ska skillnaden i upptagnings-/utsöndringskonstanterna mellan provningskoncentrationerna vara mindre än 20 % ([2]). Om inte bör koncentrationsberoende anges. Observera att väsentliga skillnader i upptagnings-/utsöndringskonstanterna mellan de tillämpade provningskoncentrationerna ska registreras och om möjligt förklaras. Om undersökningen är väl utformad ligger konfidensgränsen 95 % för BCF i regel nära ± 20 % av den härledda BCF.

Om två eller fler koncentrationer testas används resultaten från båda eller alla koncentrationerna för att undersöka om resultaten är konsekventa och visa om

([1]) Ett t-test av tillväxtkonstanterna kan utföras för att undersöka om tillväxten skiljer sig mellan kontroll- och testgrupperna, eller ett F-test om man analyserar variansen. Vid behov kan ett F-test eller sannolikhetsförhållandet användas som underlag för valet av lämplig tillväxtmodell (OECD monograf 54, (32).

([2]) Dessa procentsiffror förutsätter att analysmodellerna är tillförlitliga och att halveringstiden är < 14 dagar. Om analysmodellerna är mindre tillförlitliga eller halveringstiden ökas (stort) blir dessa siffror högre.

▼M7

koncentrationsberoende föreligger. Om bara en koncentration testas för att minska antalet använda djur och/eller resurser bör detta motiveras.

Den resulterande BCF_{SS} är osäker om BCF_K är betydligt större än BCF_{SS}, eftersom detta kan vara en indikation på att stabilt tillstånd inte uppnåtts eller att utspädning på grund av tillväxt och förlustprocesser inte har beaktats. Om BCF_{SS} är mycket högre än BCF_K bör härledningen av upptagnings- och utsöndringskonstanterna kontrolleras för fel och omvärderas. Ett annorlunda anpassningsförfarande kan förbättra uppskattningen av BCF_K (jfr Appendix 5).

Testrapport

Förutom den information om testämnet som anges i punkt 3 ska testrapporten innehålla följande uppgifter:

Testämne:

Fysisk form och, när så är tillämpligt, fysikalisk-kemiska egenskaper.

— Kemisk beteckning, såsom IUPAC- eller CAS-namn, CAS-nummer, SMILES- eller InCh-kod, strukturell formel, renhet, kemisk beteckning för orenheter i förekommande fall och när så är praktiskt möjligt osv. (vid behov, inklusive halten organiskt kol).

— För multikomponentämnen och UVCB (kemiska ämnen med okänd eller varierande sammansättning, komplexa reaktionsprodukter eller biologiska material), så långt det är möjligt, en beskrivning av de enskilda beståndsdelarnas kemiska identitet och procentandel av ämnets totala massa för varje beståndsdel. En sammanfattning av hur analysmetoden i testet återspeglar ämnets koncentrationsmått samt en beskrivning av alla analytiska förfaranden, inklusive metodens noggrannhet, detektionsgräns och kvantifieringsgräns.

— Om ämnet är radioaktivt märkt ska den märkta atomens exakta position och andelen radioaktivitet kopplad till föroreningar anges.

— Information om testämnets toxicitet för fisk (helst testarterna). Toxiciteten bör redovisas som akut 96-t LC_{50} och som NOAEC och LOAEC från en kronisk studie (dvs. test i tidigare levnadsstadier eller ett fullständigt livscykeltest om ett sådant finns tillgängligt).

— Lagringsförhållanden för testkemikalien eller testämnet samt deras stabilitet under lagringsförhållandena om de lagras före användning.

Testade arter:

Vetenskapligt namn, stam, källa, eventuell förbehandling, acklimatisering, ålder, kön (om relevant) storleksintervall (vikt och längd) osv.

Testbetingelser:

— Använt testförfarande (t.ex. genomflödestest eller semistatiskt test), ordinarie eller minimerad utformning (inklusive grund och motivering).

— Belysningens typ och egenskaper samt ljusperiod(er).

— Provets utformning, t.ex. antal och storlek på provningskammare, vattenväxlingshastighet, fisktäthet, antal replikat, antal fiskar per replikat, antal provningskoncentrationer, upptagnings- och utsöndringsfasernas längd, provtagningsfrekvens för fisk och vatten.

▼M7

— Metod för beredning av stamlösningar och förnyelsefrekvensen (lösningsmedel, dess koncentration och bidrag till innehåll av organiskt kol i provningsvattnet bör anges när sådan används) eller en beskrivning av alternativa doseringssystem.

— Nominella provningsförhållanden, medelvärden för uppmätta värden samt deras standardavvikelser i provningskärlen och metod och frekvens som använts för beräkning av dessa värden.

— Utspädningsvattnets ursprung, beskrivning av eventuell förbehandling, resultat från eventuell undersökning av fiskens förmåga att överleva i vattnet, samt vattnets karakteristik: pH, hårdhet, temperatur, koncentration löst syre, klorrestvärde (om detta mäts), total mängd organiskt kol, uppslammade fasta partiklar, salthalt i det undersökta mediet (om tillämpligt) och eventuella andra gjorda mätningar

— Vattenkvalitet i provningskärlen, pH, hårdhet, TOC, temperatur och syrehalt, använda metoder och mätningsfrekvens.

— Detaljerad information om utfodringen (t.ex. fodertyp, källa, sammansättning (åtminstone fett- och proteininnehåll)), valt utfodringsintervall, mängd och frekvens.

— Information om behandlingen av fisk- och vattenprover, inklusive uppgifter om beredning, förvaring, extraktion och analytiska förfaranden (och precision) för testämnet och fettinnehållet.

— Metoder för behandlingsrandomisering och fördelning av fisk till testkärlen.

— Uppgifter om hur fisken tillförs till testkärlen samt testets varaktighet.

— Beskrivning av preliminära tester och resultat, i förekommande fall.

Resultat:

— Resultat från eventuell preliminär studie.

— Dödligheten för kontrollfisken och fisken i varje exponerat kärl, samt eventuellt observerat onormalt beteende.

— Information om eventuella observerade negativa effekter.

— Fullständig beskrivning av alla kemiska analysförfaranden, inklusive detektions- och kvantifieringsgränser, variabilitet och återhämtning.

— Fiskens fetthalt, inklusive använd metod och normaliseringsfaktor för fetthalten om den härleds (L_n, en faktor som används för att uttrycka resultat när det gäller fetthalten på 5 %).

— Data i tabellform om fiskens vikt (och längd), kopplade till kemiska koncentrationer hos enskilda fiskar (och fetthalt i förekommande fall), för både kontroll- och exponeringsgrupperna (t.ex. med användning av unik identifiering av varje provtagningsfisk) samt beräkningar av härledda tillväxtkonstanter.

▼M7

— Data i tabellform om testämnets koncentration (C_f, kopplad till enskilda fiskar) och vatten (C_w) (med medelvärden för test- och kontrollgrupperna, standardavvikelse och intervall, i förekommande fall) för alla provtagningstillfällen (C_f, uttryckt i mg/kg våtvikt av hela kroppen eller specifika vävnader, t.ex. fett samt C_w i mg/l). C_w-värden för kontrollserierna (bakgrundsvärdet ska också redovisas).

— Kurvor (med alla uppmätta data) som visar följande (i förekommande fall kan koncentrationerna uttryckas i förhållande till hela kroppen och fetthalten normaliseras till 5 % av fisken eller specifika vävnader.

  — Tillväxt, dvs. fiskens vikt som funktion av tiden eller den naturliga logaritmen av vikten som funktion av tiden(inklusive den härledda tillväxtkonstanten k_g).

  — Testämnets upptagning och utsöndring i fisken (i ett diagram).

  — Tid till stabilt tillstånd (om det uppnås).

  — Den naturliga logaritmen av koncentrationen som funktion av upptagningstiden (inklusive den härledda upptagningskonstanten k_1).

  — Den naturliga logaritmen av koncentrationen (ln-koncentration) som funktion av utsöndringstiden (inklusive den härledda upptagningskonstanten k_2).

  — Både upptagnings- och utsöndringsfaskurvorna, som visar både data och den anpassade modellen.

— Om en visuell inspektion av ett diagram visar uppenbara avvikande värden kan ett statistiskt giltigt test för avvikande värden tillämpas för att avlägsna felaktiga datapunkter. Uteslutandet av dessa värden ska dokumenteras och motiveras.

— Biokoncentrationsfaktorn i stabilt tillstånd (BCF_{SS}), om stabilt tillstånd (nästan) har uppnåtts.

— Kinetisk biokoncentrationsfaktor (BCF_K) och härledda upptagnings- och utsöndringskonstanter k_1 och k_2, tillsammans med varianser i k_2 (lutning och skärningspunkt) om gradvis anpassning används.

— Konfidensgränser, standardavvikelser (i förekommande fall) och metoder för beräkning/dataanalys för varje parameter för varje koncentration av det använda testämnet.

  — Eventuell information om metaboliter från radioaktivt märkta testämnen och metaboliternas ackumulation.

  — Tillväxtkonstanter (inklusive konfidensintervall på 95 %) och beräknad utsöndringskonstant korrigerad för tillväxt (k_{2g}), halveringstid och BCF-värden (BCF_{Kg}).

  — Eventuella anmärkningar avseende undersökning, eventuell avvikelse från förfarandet och annan relevant information.

  — En sammanfattning av relevanta uppmätta och beräknade data, enligt följande:

▼M7

Upptagnings- och utsöndringskonstanter för ämnet samt biokoncentrationsfaktorer (BCF)	
k_g (tillväxtkonstant, dag^{-1}):	Insatsvärde (95 % CI) (1)
k_1 (total upptagningskonstant, l kg^{-1} dag^{-1}):	Insatsvärde (95 % CI) (1)
k_2 (total utsöndringskonstant, dag^{-1}):	Insatsvärde (95 % CI) (1)
k_{2g} (tillväxtkorrigerad utsöndringskonstant, dag^{-1}):	Insatsvärde (95 % CI) (1)
C_f (kemisk koncentration i fisken vid stabilt tillstånd, mg kg^{-1}):	Insatsvärde ± SD (2)
C_w (kemisk koncentration i vattnet, mg l^{-1}):	Insatsvärde ± SD (2)
L_n (normaliseringsfaktor för fetthalt):	Insatsvärde (3)
BCF_{SS} (BCF i stabilt tillstånd l kg^{-1})	Insatsvärde ± SD (2)
BCF_{SSL} (normaliserad fetthalt, BCF i stabilt tillstånd, l kg^{-1}):	Insatsvärde (3) ± SD (2)
BCF_K (kinetisk BCF, l kg^{-1})	Insatsvärde (95 % CI) (1)
BCF_{Kg} (tillväxtkorrigerad kinetisk BCF, l kg^{-1})	Insatsvärde (95 % CI) (1)
$t_{1/2g}$ (tillväxtkorrigerad halveringstid, dag):	Insatsvärde (95 % CI) (1)
BCF_{KL} (kinetisk BCF normaliserad för fetthalt, l kg^{-1}):	Insatsvärde
BCF_{KLG} (normaliserad fetthalt, tillväxtkorrigerad kinetisk BCF, l kg^{-1}):	Insatsvärde

(1) CI: konfidensintervall (om en uppskattning är möjlig)
(2) SD: Standardavvikelse (om en uppskattning är möjlig)

Resultat som redovisas som t.ex. ”ej upptäckt/kvantifierad vid detektions-/kvantifieringsgränsen” vid framtagningen av undersökningsmetoden och dess experimentella utformning bör undvikas, eftersom sådana resultat inte kan användas för beräkning av hastighetskonstanter.

C.13 – II: **TEST PÅ FISK MED MINIMERAD EXPONERING VIA VATTEN**

INLEDNING

Den ökande erfarenheten av att utföra och tolka det fullständiga testet, både bland laboratorier och tillsynsmyndigheter, visar att första ordningen kinetik, med vissa undantag, gäller för uppskattningen av upptagnings- och utsöndringskonstanterna. Upptagnings- och utsöndringskonstanterna kan därför uppskattas med ett minimum av provtagningspunkter, och kinetisk BCF kan härledas.

Syftet med att undersöka alternativa utformningar av BCF-undersökningar var ursprungligen att utveckla ett mindre test som kan användas i det mellanliggande testningssteget för att vederlägga eller bekräfta BCF-uppskattningar baserat på K_{OW} och QSAR:s, och eliminera behovet av en fullständig undersökning för många ämnen. Ett annat skäl var att minska kostnaderna och användningen av försöksdjur genom att minska provtagningen och antalet analytiska sekvenser.

▼M7

Det nya testet har samma utformning som den tidigare testmetoden för att möjliggöra integration av testresultaten med befintlig BCF-data och underlätta testningen och tolkningen genom att tillhandahålla BCF-uppskattningar med tillräcklig noggrannhet och precision för riskbedömningsbeslut. Många av överväganden är desamma som i det fullständiga testet, t.ex. giltighetskriterierna (jfr punkt 24) och att testet ska upphöra om obetydlig upptagning registreras i slutet av upptagningsfasen (jfr punkterna 16 och 38).

De ämnen som kan komma i fråga för det minimerade testet bör höra till det allmänna område som testmetoden utvecklades för, dvs. icke-polära organiska ämnen (jfr punkt 49). Om det finns indikationer på att det ämne som ska testas kan bete sig på ett annorlunda sätt (t.ex. en tydlig avvikelse från första ordningens kinetik) bör ett fullständigt test utföras för tillsynsändamål.

Det minimerade testet körs vanligen inte under en kortare period än standard-BCF-testet, men antalet provtagningar är färre (grunden för detta anges i tillägg 6). Utsöndringsperioden kan dock förkortas för snabbt utsöndrande ämnen för att undvika att koncentrationerna i fisken faller under detektions-/kvantifieringsgränsen innan testet avslutas. Ett minimerat fiskexponeringstest med en enda koncentration kan användas för att fastställa om ett fullständigt test behövs. Om de data som används för att beräkna konstanter och BCF är robusta (jfr punkt 93) kan man avstå från att utföra det fullständiga testet om den resulterande BCF ligger långt från lagstadgade riskgränser.

I vissa fall kan det vara fördelaktigt att utföra det minimerade testet med fler än en testkoncentration som ett preliminärt test för att avgöra om BCF-uppskattningarna för ett ämne är koncentrationsberoende. Om BCF-uppskattningarna från det minimerade testet visar koncentrationsberoende måste det fullständiga testet utföras. Om BCF-uppskattningarna baserat på ett minimerat test inte är koncentrationsberoende men resultaten inte anses vara definitiva, kan ett eventuellt fullständigt test utföras vid en enda koncentration. På så sätt används färre djur jämfört med ett fullständigt test med två (eller flera) koncentrationer.

Ämnen som eventuellt kan komma i fråga för det minimerade testet bör uppfylla följande kriterier:

— Sannolikt uppvisa ungefärlig första ordningens upptagnings- och utsöndringskinetik, härlett från jämförelser med liknande ämnen.

— Ha en log K_{OW} < 6, om inte snabb metabolism förväntas ([1]).

— Vara tillräckligt vattenlösliga med avseende på analystekniken (jfr punkt 24).

— Vara tydligt kvantifierbara (dvs. koncentrationerna bör vara minst en storleksordning över kvantifieringsgränsen) både i fisk och vatten. Radioaktiv märkning rekommenderas (jfr punkt 23).

— Ha en utsöndringsperiod som är längre än den förutsagda halveringstiden (jfr tillägg 5 för beräkningar), eller så bör utsöndringsfasens varaktighet justeras därefter (jfr punkt 91). Undantag från denna regel är tillåtna om ämnet förväntas ha en snabb metabolism.

([1]) Det minimerade testet kan användas för att visa snabb metabolism när det är känt att detta är sannolikt.

▼M7

PROVTAGNINGSSCHEMA FÖR DET MINIMERADE TESTET

Provtagning av fisk

Provtagningen av fisken minskas till fyra provtagningspunkter:

— I mitten och i slutet av upptagningsfasen (den senare utgör början av utsöndringsfasen), t.ex. efter 14 och 28 dagar (33).

— I mitten av utsöndringsfasen och när undersökningen avslutas (om ämneskoncentrationen är < 10 % av den maximala koncentrationen eller åtminstone tydligt längre än en halveringstid för ämnet), t.ex. efter 7 och 14 dagars utsöndring (33). Om snabb utsöndring förväntas eller observeras kan det vara nödvändigt att förkorta utsöndringsperioden för att undvika att koncentrationerna i fisken faller under kvantifieringsgränsen.

— Mätning av fetthalten som i en fullständig undersökning.

— Korrigering för tillväxt som i en fullständig undersökning.

— BCB beräknas som kinetisk BCF.

Vattenprovtagning

I det minimerade testet tas prover av vattnet som i den fullständiga undersökningen (jfr punkt 54) eller åtminstone vid fem tillfällen jämnt fördelade under upptagningsfasen samt veckovis under utsöndringsfasen.

Ändringar av utformningen

Med beaktande av testämnets egenskaper, giltiga QSAR-prediktioner och det specifika ändamålet med undersökningen kan vissa ändringar av undersökningens utformning övervägas:

— Om större precision krävs kan fler fiskar (sex eller åtta i stället för fyra) användas för provet i slutet av upptagningsfasen.

— En extra grupp av fiskar kan inbegripas om utsöndringen efter 14 dagar (eller när utsöndringsfasen beräknas avslutas) inte har varit tillräcklig för lämplig utsöndring (dvs. > 50 %). Om den förutsagda varaktigheten av utsöndringsfasen är kortare eller längre än 14 dagar kan provtagningsschemat anpassas (dvs. en grupp av fiskar vid den tidpunkt då utsöndringsfasen beräknas avslutas och en grupp efter halva den tiden).

— Två testkoncentrationer kan användas för att undersöka eventuellt koncentrationsberoende. Om resultaten från det minimerade testet utfört med två testkoncentrationer visar att BCF inte är koncentrationsberoende (dvs. varierar med mindre än 20 %) kan en testkoncentration anses vara tillräcklig i det fullständiga testet, om det utförs.

— Modeller för bioackumuleringsprocesser som den som föreslagits av Arnot m.fl. (35) kan sannolikt användas som hjälp i planeringen av längden för upptagnings- och utsöndringsfaserna (se även tillägg 5).

Beräkningar

Den logiska grunden för denna metod är att biokoncentrationsfaktorn i ett fullständigt test antingen kan bestämmas som biokoncentrationsfaktorn i stabilt tillstånd (BCF_{SS}) genom att beräkna förhållandet mellan koncentrationen av testämnet i fiskens vävnader och testämnets koncentration i vatten, eller genom att beräkna den kinetiska biokoncentrationsfaktorn (BCF_K) som förhållandet mellan upptagningshastighetskonstanten k_1 och utsöndringskonstanten k_2. BCF_K är

▼M7

giltig även om ämnets koncentration inte uppnår stabilt tillstånd under upptagningsfasen, under förutsättning att upptagningen och utsöndringen sker ungefär enligt första ordningens kinetiska processer. Som ett absolut minimum krävs två datapunkter för att uppskatta upptagnings- och utsöndringskonstanterna, en i slutet av upptagningsfasen (dvs. i början av utsöndringsfasen) och en i slutet (eller efter en betydande del) av utsöndringsfasen. Den mellanliggande provtagningspunkten rekommenderas som kontroll av upptagnings- och utsöndringskinetiken ([1]). Beräkningar anges i tilläggen 5 och 6.

Tolkning av resultaten.

För att bedöma testets giltighet och informationsvärde måste man kontrollera att utsöndringsperioden är längre än en halveringstid. Även BCF_{km} (kinetisk BCF, härledd från ett minimerat test) bör jämföras med det minimerade värdet för BCF_{SS} (som är BCF_{SS} beräknad i slutet av upptagningsfasen, med antagandet att stabilt tillstånd har uppnåtts). Detta kan bara antas, eftersom antalet provtagningspunkter inte är tillräckligt för att bevisa detta. Om BCF_{km} < minimerad BCF_{SS} bör minimerad BCF_{SS} vara det föredragna värdet. Om BCF_{km} är mindre än 70 % av den minimerade BCF_{SS} är resultaten inte giltiga och ett fullständigt test bör genomföras.

Om det minimerade testet ger en BCF_{km} i intervallet för ett värde som ger upphov till risk bör ett fullständigt test utföras. Om resultatet ligger långt ett utanför ett värde som ger upphov till risk (långt över eller långt under) kan ett fullständigt test inte vara nödvändigt, eller så kan ett fullständigt test med en enda koncentration utföras om det krävs enligt det relevanta regelverket.

Om ett fullständigt test visar sig vara nödvändigt efter ett minimerat test vid en koncentration kan det fullständiga testet utföras vid en andra koncentration. Om resultaten är konsekventa behöver man inte utföra ett ytterligare fullständigt test vid en annan koncentration eftersom ämnets biokoncentration inte förväntas vara koncentrationsberoende. Om det minimerade testet har utförts vid två koncentrationer och resultaten inte visar på koncentrationsbeteende kan det fullständiga testet utföras med endast en koncentration (jfr punkt 87).

Testrapport

Testrapporten för det minimerade testet ska innehålla all information som krävs för det fullständiga testet (jfr punkt 81), med undantag för uppgifter som inte kan tas fram (dvs. en kurva som visar tiden till stabilt tillstånd och biokoncentrationsfaktorn för stabilt tillstånd; för den senare bör minimerad BCF_{ss} anges i stället). Testrapporten ska även innehålla en förklaring av skälet till att det minimerade testet använts samt resulterande BCF_{km}.

C.13 – III: TEST AV BIOACKUMULERING I FISK GENOM EXPONERING VIA FÖDA

INLEDNING

Den metod som beskrivs i detta avsnitt bör användas för ämnen där metoden för exponering via vatten inte är praktiskt genomförbar (t.ex. på grund av att stabila mätbara vattenkoncentrationer inte kan upprätthållas eller lämplig kroppsbelastning inte kan uppnås inom 60 dagars exponering, se föregående avsnitt om vattenexponeringsmetoden). Man bör dock vara medveten om att endpointen för test med exponering via föda är en biomagnifikationsfaktor (BMF), inte en biokoncentrationsfaktor (BCF) ([2]).

I maj 2001 presenterades en ny metod för testning av bioackumulering för organiska ämnen som är svårlösliga i vatten vid SETAC:s Europakonferens som hölls i Madrid (36). Arbetet bygger på olika rapporterade bioackumuleringsstudier i litteraturen, med användning av en doseringsmetod med foder behandlat med testämne (nedan kallat *behandlat foder*) (t.ex. (37)). Tidigt 2004 lades ett utkast till protokoll (38), som utformats för att mäta bioackumuleringspotentialen

([1]) När endast två datapunkter mäts kan uppskattningar av konfidensgränserna för BCF_{km} göras med hjälp av bootstrappingmetoder. När även mellanliggande datapunkter finns tillgängliga kan konfidensgränserna för BCF_{km} beräknas som i det fullständiga testet.

([2]) Se tillägg 1 för definitioner och enheter.

▼M7

hos organiska ämnen som är svårlösliga i vatten, för vilka standardmetoden för biokoncentration med exponering via vatten inte är praktiskt genomförbar, tillsammans med ett bakgrundsdokument (39) fram för en EU-PBT-arbetsgrupp. En ytterligare motivering för metoden var att eventuell miljöexponering för sådana svårlösliga ämnen (dvs. log K_{OW} > 5) ofta kan ske via föda (jfr (40) (41) (42) (43) (44)). Av denna anledning innehåller vissa offentliggjorda kemikalieföreskrifter hänvisningar till tester med exponering via föda ([1]). Man bör dock vara medveten om att i den metod som beskrivs här undviks exponering via vattenfasen noggrant, vilket innebär att ett BMF-värde från detta test inte kan jämföras direkt med ett BMF-värde från en fältstudie (där både exponering via vatten och föda kan kombineras).

Det här avsnittet baseras på detta protokoll (38) och en ny metod som inte fanns med i den föregående versionen av testmetod C.13. Detta alternativa test gör det möjligt att direkt undersöka exponeringsvägen via föda under kontrollerade laboratorieförhållanden.

Forskare bör konsultera punkterna 1 till 14 i denna testmetod för information om när testet med exponering via föda är att föredra framför vattenexponeringstestet. Avsnittet innehåller även information om vad man bör tänka på när det gäller olika ämnen och denna information bör konsulteras innan ett test genomförs.

Användning av radioaktivt märkta testämnen kan övervägas och här gäller samma hänsynstaganden som för vattenexponeringsmetoden (jfr punkterna 6 och 65).

Metoden med exponering via föda kan användas för att testa fler än ett ämne i ett enda test. Vissa villkor måste dock vara uppfyllda, som beskrivs närmare i punkt 112. För enkelhetens skull används endast ett testämne i den testmetod som beskrivs här.

Testet med exponering via föda liknar vattenexponeringsmetoden i många avseenden, naturligtvis med undantag för exponeringsvägen. Många aspekter av den metod som beskrivs här överlappar därför den vattenexponeringsmetod som beskrivs i det föregående avsnittet. Korshänvisningar till relevanta punkter i föregående avsnitt görs i möjligaste mån, men för att underlätta läsningen och förståelsen är det oundvikligt att viss information upprepas.

TESTMETODENS PRINCIP

Genomflödes- eller semistatiska betingelser kan användas (jfr punkt 4). Genomflödesbetingelser rekommenderas för att begränsa eventuell exponering av testämnet via vatten till följd av desorption från behandlat foder eller avföring. Testet består av två faser: upptagning (testämnet i behandlat foder) och utsöndring (rent, obehandlat foder (jfr punkt 16). I upptagningsfasen utfodras en ”testgrupp” av fiskar dagligen med en fast föda bestående av ett kommersiellt fiskfoder med känd sammansättning, som behandlas med testämnet. Fisken bör helst

([1]) Vid tillämpningen av förordning (EG) nr 1907/2006 om registrering, utvärdering, godkännande och begränsning av kemikalier (Reach) (EGT L 396, 30.12.2006, s. 1) tas denna fråga upp i Vägledning om informationskrav och kemikaliesäkerhetsbedömning, kapitel R.7c, R.7.10.3.1, R.7.10.4.1 och figur R7.10-2.

▼M7

äta allt foder som ges (jfr punkt 141). Fisken utfodras sedan med det rena, obehandlade kommersiella fiskfodret under utsöndringsfasen. Precis som för vattenexponeringsmetoden kan fler än en testgrupp med andra behandlade testämneskoncentrationer användas vid behov, men för de flesta av de starkt hydrofoba organiska testämnena är en testgrupp tillräcklig (jfr punkterna 49 och 107). Om semistatiska betingelser används bör fisken överföras till ett nytt medium och/eller en ny testkammare i slutet av upptagningsfasen (i det fall de medier och/eller apparater som används i upptagningsfasen har förorenats med testämnet genom läckage). Testämnets koncentrationer i fisken mäts i båda faserna av testet. Förutom den grupp fiskar som utfodras med det behandlade fodret (testgruppen) hålls och utfodras en kontrollgrupp av fiskar under identiska betingelser, förutom att det kommersiella fiskfodret inte är behandlat med testämnet. Denna kontrollgrupp möjliggör kvantifiering av testämnets bakgrundsnivåer hos oexponerad fisk och tjänar som en jämförelse med avseende på eventuella behandlingsrelaterade negativa effekter som noteras hos testgrupperna ([1]). Kontrollgruppen möjliggör också jämförelser av tillväxtkonstanterna mellan grupperna som en kontroll av att liknande mängder av fodret har konsumerats (eventuella skillnader i fodrets smaklighet bör också övervägas som ett skäl till att tillväxtkonstanterna skiljer sig åt (jfr punkt 138). Det är viktigt att test- och kontrollgrupperna utfordras med foder med samma näringsvärde under både upptagnings- och utsöndringsfasen.

Baserat på metodutvecklarnas erfarenheter är en upptagningsfas på 7–14 dagar vanligen tillräcklig (38) (39). Denna längd kan minimera kostnaden för testet, samtidigt som tillräcklig exponering säkerställs för de flesta ämnen. I vissa fall kan upptagningsfasen dock behöva förlängas (jfr punkt 127). Ämneskoncentrationen i fisken kanske inte når stabilt tillstånd under upptagningsfasen. Databehandling och resultat från denna metod baseras därför vanligen på en kinetisk analys av vävnadsrester. (Obs: Ekvationer för uppskattning av tiden till stabilt tillstånd kan tillämpas på samma sätt som för exponeringstestet i vatten – se tillägg 5). Utsöndringsfasen inleds när fisken börjar utfodras med obehandlat foder och varar i regel upp till 28 dagar eller tills testämnet inte längre kan kvantifieras i hel fisk, beroende av vad som inträffar först. Utsöndringsfasen kan förkortas eller förlängas utöver de 28 dagarna, beroende på förändringar i tid i uppmätta kemiska koncentrationer och fiskens storlek.

Denna metod gör det möjligt att bestämma ämnesspecifik halveringstid ($t_{1/2}$, från utsöndringskonstanten, k_2), assimileringseffektivitet (absorption genom tarmen, *a*), kinetisk biomagnifikationsfaktor för födotest (BMF_K), tillväxtkorrigerad kinetisk biomagnifikationsfaktor för födotest (BMF_{Kg}) och kinetisk biomagnifikationsfaktor korrigerad för fetthalt ([2]) (BMF_{KL}) (och/eller biomagnifikationsfaktor korrigerad för tillväxt och fetthalt, BMF_{KgL}) för testämnet i fisken. Precis som för vattenexponeringsmetoden kommer ökningen av fiskmassa under testet att leda till en utspädning av testämnet i växande fisk, och (den kinetiska) BMF kommer att underskattas om den inte korrigeras för tillväxt (jfr punkterna 162 och 163). Om det uppskattas att stabilt tillstånd uppnåddes i upptagningsfasen kan en vägledande BMF för stabilt tillstånd beräknas. Det finns metoder som gör det möjligt att uppskatta en kinetisk biokoncentrationsfaktor (BCF_K) från de data som genereras i testet med exponering via föda (t.ex. (44) (45) (46) (47) (48). För- och nackdelar med sådana metoder diskuteras i tillägg 8.

([1]) De flesta testämnen bör helst inte kunna detekteras i kontrollvattnet. Bakgrundskoncentrationerna bör endast vara relevanta för naturligt förekommande material (t.ex. vissa metaller) och ämnen som finns överallt i miljön.

([2]) Eftersom BMF definieras som förhållandet mellan ett ämnes koncentration i en organism och i organismens foder vid stabilt tillstånd beaktas fetthalten genom en korrigering för fetthalten i organismen och i fodret, och beskrivs därför mer exakt som en ”korrigering”. Denna metod skiljer sig från ”normalisering” till en fastställd fetthalt hos organismen, vilket görs i biokoncentrationstestet med vattenexponering.

▼M7

Testet utformades ursprungligen för svårlösliga icke-polära organiska ämnen, som ungefär följer första ordningens kinetik för upptagning och utsöndring hos fisk. Om ett testat ämne inte ungefär följer första ordningens kinetik för upptagning och utsöndring ska mer komplexa modeller tillämpas (se litteraturhänvisningar i tillägg 5) och råd inhämtas från biostatistiker och/eller farmakokinetiker.

BMF fastställs vanligen med en analys av testämnet i hel fisk (våtvikt). Om det är relevant för undersökningens syften kan specifika vävnader (t.ex. muskler, lever) provtas om fisken delas upp i ätliga och oätliga delar (jfr punkt 21). Dessutom kan man avlägsna mag-tarmkanalen och analysera den separat för att bestämma bidraget till koncentrationer i hela fiskar för provtagningspunkter i slutet av upptagningsfasen och nära början av utsöndringsfasen, eller som en del av en massbalansmetod.

Fetthalten i hela provtagningsfiskar bör mätas så att koncentrationerna kan korrigeras för fetthalt, med beaktande av fetthalten både i fodret och hos fisken (jfr punkterna 56 och 57 samt tillägg 7).

Enskilda provtagningsfiskars vikt bör mätas och registreras och kopplas till den analyserade kemiska koncentrationen hos de enskilda fiskarna (t.ex. rapporterad med en unik identifieringskod för varje provtagningsfisk) för att beräkna eventuell tillväxt under testet. Fiskens totala längd bör också mätas om det är möjligt ([1]). Viktdata är också nödvändiga för att uppskatta BCF med hjälp av utsöndringsdata från testet med exponering via föda.

INFORMATION OM TESTÄMNET

Information om testämnet enligt beskrivningen i punkterna 3 och 22 bör finnas tillgänglig. Vanligen behövs ingen analytisk metod för testämneskoncentrationerna i vatten. Metoderna måste vara tillräckligt känsliga för att mäta koncentrationerna i fiskfodret och fiskvävnaderna.

Metoden kan användas för att testa fler än ett ämne i ett enda test. Testämnena bör emellertid vara kompatibla med varandra så att de inte samverkar eller ändrar sin kemiska identitet när de blandas i fiskfodret. Syftet är att skillnaderna mellan de uppmätta resultaten för varje ämne som testas tillsammans inte ska vara stora jämfört med om individuella tester hade gjorts av varje testämne. Preliminärt analysarbete bör fastställa att varje ämne kan återhämtas från foder som behandlats med flera ämnen och från fiskvävnadsproverna med i) hög återhämtning (t.ex. > 85 % av nominalvärdet), och ii) den nödvändiga sensitiviteten för testning. Den totala dosen för ämnen som testas tillsammans bör vara lägre än den kombinerade koncentration som kan orsaka toxiska effekter (jfr punkt 51). Dessutom bör eventuella negativa effekter hos fisken och risken för interaktiva effekter (t.ex. metaboliska effekter) i samband med testning av flera ämnen samtidigt beaktas i utformningen av försöket. Samtidig testning av ämnen som kan joniseras bör undvikas. När det gäller exponering är metoden även lämplig för komplexa blandningar (jfr punkt 13), även om samma analysbegränsningar som för andra metoder gäller).

TESTETS GILTIGHET

För att ett test ska vara giltigt måste följande villkor uppfyllas (jfr punkt 24):

— Vattentemperaturen ska variera med mindre än ± 2 °C hos behandlings- och kontrollgrupperna.

([1]) Dessutom bör total längd registreras under testet, eftersom detta är en bra indikator på eventuella negativa effekter.

▼M7

— Koncentrationen löst syre får inte falla under luftmättnadsvärdet på 60 %.

— Koncentrationen av testämnet i fiskfodret före och efter slutet av upptagningsfasen ska ligga inom intervallet ± 20 % (baserat på minst tre prover vid båda tidpunkterna).

— Ämnet ska visa en hög nivå av homogenitet i fodret i den preliminära analysen av det behandlade fodret. Minst tre provkoncentrationer för ämnet som tas vid teststarten ska inte variera med mer än ± 15 % från medelvärdet.

— Koncentrationer av testämnet ska inte detekteras eller endast förekomma vid typiska spårnivåer i obehandlat foder eller i kontrollfiskarnas vävnader i förhållande till de behandlade proverna.

— Dödlighet eller andra negativa effekter/sjukdomar hos både kontroll- och testgrupperna ska vara ≤ 10 % i slutet av testet. Om testet förlängs av någon anledning ska negativa effekter i båda grupperna vara ≤ 5 % per månad och ≤ 30 % kumulativt. Signifikanta skillnader i den genomsnittliga tillväxten mellan test- och kontrollgrupperna kan vara en indikation på testämnets toxiska effekt.

REFERENSÄMNEN

Om ett laboratorium inte har utfört testet tidigare eller väsentliga förändringar (t.ex. förändringar av fiskstammen eller leverantören, andra fiskarter, signifikant ändring av fiskens storlek, foder eller inblandningsmetod osv.) har gjorts är det lämpligt att en teknisk kompetensstudie utförs med ett referensämne. Referensämnet används främst för att fastställa huruvida tekniken för att behandla fodret är lämplig för att garantera maximal homogenitet och biotillgänglighet för testämnena. Ett exempel som har använts när det gäller icke-polära hydrofoba ämnen är hexaklorbensen (HCB) men andra ämnen med tillförlitliga data om upptagning och biomagnifikation bör övervägas med tanke på HCB:s farliga egenskaper ([1]). Om referensämnen används bör grundläggande information anges i testrapporten, inklusive beteckning, renhet, CAS-nummer, struktur och toxicitetsdata (i förekommande fall), precis som för testämnena (jfr punkterna 3 och 22).

BESKRIVNING AV TESTMETODEN

Utrustning

Material och apparater bör användas enligt beskrivningen i vattenexponeringsmetoden (jfr punkt 26). Ett testsystem med genomflöde eller statisk förnyelse som ger en tillräcklig volym av utspädningsvatten till testtankarna bör användas. Flödestakten bör registreras.

Vatten

Testvatten bör användas enligt beskrivningen i vattenexponeringsmetoden (jfr punkterna 27–29). Testmediet bör karakteriseras enligt beskrivningen och bör hålla en konstant kvalitet under testet. Halten av naturliga partiklar och totalt organiskt kol bör vara så låga som möjligt (≤ 5 mg/l partiklar, ≤ 2 mg/l totalt organiskt kol) innan testet inleds. TOC behöver endast mätas före testet som en del av testvattenkarakteriseringen (jfr punkt 53).

([1]) HCB finns med i bilagorna A och C till Stockholmskonventionen och i bilagorna I och III till förordning (EG) nr 850/2004 om långlivade organiska föreningar (EUT L 158, 30.4.2004, s. 7).

▼M7

Foder

Ett kommersiellt tillgängligt fiskfoder (flytande och/eller långsamt sjunkande pelleterat foder) som karakteriseras för minst protein- och fetthalt rekommenderas. Foderpelletarna bör ha en enhetlig storlek för att öka effektiviteten i foderexponeringen, dvs. fisken äter mer av fodret i stället för att äta de större bitarna och missa de mindre. Pelletarna bör ha en lämplig storlek i förhållande till fiskens storlek i början av testet (t.ex. kan pellets med en diameter på ungefär 0,6–0,85 mm för fisk med en total längd på 3–7 cm och 0,85–1,2 mm för fisk med en total längd på 6–12 cm användas). Pelletsstorleken kan justeras beroende på fiskens tillväxt i början av utsöndringsfasen. Ett exempel på en lämplig fodersammansättning som finns kommersiellt tillgänglig ges i tillägg 7. Testfoder med en total fetthalt på mellan 15 och 20 viktprocent har vanligen använts vid utvecklingen av denna metod. Fiskfoder med en så hög fetthalt kanske inte finns tillgänglig i vissa regioner. I ett sådant fall kan undersökningen utföras med foder med en lägre fetthalt, och vid behov kan utfodringsintervallerna justeras på lämpligt sätt för att upprätthålla fiskens hälsa (baserat på preliminära tester). Den totala fetthalten i fodret för test- och kontrollgruppen ska mätas och registreras innan testet inleds och i slutet av upptagningsfasen. Uppgifter från leverantören av det kommersiella fodret om analys av näringsämnen, fetthalt, fibrer och aska, och om möjligt mineraler och bekämpningsmedelsrester (t.ex. ”vanliga” prioriterade förorenande ämnen), bör anges i undersökningsrapporten.

När fodret behandlas med testämnet måste man försäkra sig om att testfodret är homogent. Koncentrationen av testämnet i fodret för testgruppen bör väljas med hänsyn till analysteknikens sensitivitet, testämnets toxicitet (NOEC om känt) samt relevanta fysikalisk-kemiska data. Om ett referensämne används bör det helst inbegripas i en koncentration kring 10 % av testämnets koncentration (den bör i alla händelser vara så låg som möjligt) beroende på analysens sensitivitet (för hexaklorbensen har t.ex. en koncentration i fodret på 1–100 μg/g befunnits godtagbar, jfr (47) för mer information om HCB:s assimileringseffektivitet).

Testämnet kan blandas i fiskfodret på olika sätt beroende på dess fysikaliska egenskaper och löslighet (närmare uppgifter om inblandningsmetoder anges i tillägg 7):

— Om testämnet är lösligt och har stabila triglycerider bör ämnet lösas upp i en liten mängd fiskolja eller ätbar vegetabilisk olja innan det blandas med fiskfodret. I detta fall bör man vara noga med att undvika att producera en ranson som har för hög fetthalt, med hänsyn till den naturliga fetthalten i det behandlade fodret, genom att tillsätta den minsta kända oljemängd som krävs för att uppnå en jämn fördelning av testämnet i fodret.

— Fodret bör behandlas med hjälp av ett lämpligt organiskt lösningsmedel, utan att det påverkar homogeniteten och biotillgängligheten (det kan hända att (mikro)kristaller av testämnet bildas i fodret till följd av lösningsmedlets avdunstning och det är svårt att visa att detta inte har skett, jfr (49)).

— Icke-viskösa vätskor bör tillsättas direkt i fiskfodret, men de bör vara väl blandade för att säkerställa homogenitet och underlätta assimilering. Blandningstekniken bör säkerställa homogenitet i det behandlade fodret.

▼M7

I ett fåtal fall, t.ex. när det gäller mindre hydrofoba testämnen som mer sannolikt desorberas från fodret, kan det vara nödvändigt att täcka de beredda foderpelletarna med en liten mängd majs-/fiskolja (se punkt 142). I ett sådant fall bör kontrollfodret behandlas på liknande sätt och det färdigberedda fodret användas för mätning av fetthalten.

Om referensämnen användas bör deras resultat vara jämförbara med data från litteraturen om undersökningar som har utförts under liknande förhållanden med jämförbara utfodringsintervaller (jfr punkt 45) och specifika parametrar för referensämnena bör uppfylla de relevanta kriterierna i punkt 113 (tredje, fjärde och femte styckena).

Om en bärarolja eller ett bärarlösningsmedel används som vehikel för testämnet bör en motsvarande mängd av samma vehikel (exklusive testämnet) blandas med kontrollfodret så att den motsvarar det behandlade fodret. Det är viktigt att test- och kontrollgrupperna utfodras med foder med samma näringsvärde under både upptagnings- och utsöndringsfasen.

Det behandlade fodret bör förvaras under förhållanden där testämnets stabilitet i foderblandningen upprätthålls (t.ex. kylning). Förvaringsförhållandena ska redovisas.

Val av fiskart

Samma fiskarter som anges för vattenexponeringstestet kan användas (jfr punkt 32 och tillägg 3). Regnbåge (*Oncorhynchus mykiss*), karp (*Cyprinus carpio*) och knölskallelöja (*Pimephales promelas*) har ofta använts i studier av bioackumulering av organiska ämnen vid exponering via föda innan denna testmetod publicerades. Testarterna bör ha ett födobeteende som ger snabb konsumtion av de givna foderransonerna för att säkerställa att eventuella faktorer som kan påverka testämnets koncentration i fodret (t.ex. läckage till vatten och möjlighet till vattenexponering) begränsas till ett minimum. Fisk inom det rekommenderade storleks-/viktintervallet (jfr tillägg 3) bör användas. Fisken får inte vara så liten att den blir svår att analysera individuellt. Fiskarter som testas under ett stadium med snabb tillväxt kan försvåra datatolkningen, och hög tillväxttakt kan påverka beräkningen av assimileringseffektiviteten ([1]).

Fiskhållning

Acceptanskriterierna för acklimatisering, dödlighet och sjukdom är desamma som för vattenexponeringstestet innan testet utförs (jfr punkterna 33–35).

TESTFÖRFARANDE

Förberedande arbete och preliminärt test

Förberedande analytiskt arbete är nödvändigt för att visa att ämnet återhämtas från det behandlade fodret/den behandlade fiskvävnaden. Ett preliminärt test för att välja en lämplig koncentration i fodret är inte alltid nödvändigt. Preliminära försök kan utföras för att visa att inga negativa effekter observeras och utvärdera om det behandlade fodret är smakligt samt av analysmetodens sensitivitet för

([1]) För snabb tillväxt under upptagningsfasen minskas det faktiska utfodringsintervallet under det intervall som fastställdes i början av exponeringen.

▼M7

fiskvävnader och foder och val av lämpliga utfodrings- och provtagningsintervall under utsöndringsfasen osv. Detta är dock inte obligatoriskt. En preliminär undersökning kan dock vara värdefull för att uppskatta det fiskantal som behövs för provtagning under utsöndringsfasen. Detta kan leda till en avsevärd minskning av fiskantalet, speciellt för testämnen som är särskilt mottagliga för metabolism.

Exponeringsförhållanden

Upptagningsfasens längd

En upptagningsfas på 7–14 dagar är vanligen tillräcklig. Under denna fas utfodras en fiskgrupp dagligen med kontrollfodret och en annan grupp med testfodret med en fast ranson beroende på vilka arter som testas och försöksbetingelserna, t.ex. 1–2 % av kroppsvikten (våtvikt) för regnbåge. Foderintervallerna bör väljas så att snabb tillväxt och stora ökningar av fetthalten undviks. Vid behov kan upptagningsfasen förlängas baserat på praktisk erfarenhet från tidigare undersökningar eller kunskap om testämnets (eller det analoga ämnets) upptagning/utsöndring i fisk. Teststarten är tidpunkten för den första utfodringen med behandlat foder. En försöksdag löper från utfodringstidpunkten till kort före tidpunkten för nästa utfodring (t.ex. en timme). Den första försöksdagen för upptagningen löper således från tidpunkten för den första utfodringen med behandlat foder och avslutas kort före den andra utfodringen med behandlat foder. I praktiken avslutas upptagningsfasen kort före (t.ex. en timme) den första utfodringen med obehandlat testfoder, eftersom fisken fortsätter att smälta det obehandlade fodret och absorberar testämnet under de mellanliggande 24 timmarna. Det är viktigt att se till att en tillräcklig hög (icke-toxisk) kroppsbelastning uppnås för testämnet med avseende på analysmetoden, så att åtminstone en minskning av storleksordningen kan mätas under utsöndringsfasen. I specialfall kan en förlängd upptagningsfas (upp till 28 dagar) användas med ytterligare provtagning för att ge insikt i upptagningskinetiken. Koncentrationen i fisken får inte nå stabilt tillstånd under upptagningsfasen. Ekvationer för uppskattning av tiden till stabilt tillstånd som en indikation på den tid som sannolikt krävs för att uppnå uppskattbara koncentrationer i fisken kan tillämpas här på samma sätt som för vattenexponeringstestet (jfr tillägg 5).

I vissa fall kan det vara känt att upptagning av ämnet i fisken under 7–14 dagar inte är tillräckligt för att den använda foderkoncentrationen ska nå en tillräcklig hög koncentration i fisken så att minst en minskning av storleksordningen kan analyseras under utsöndringsfasen, antingen på grund av dålig analyskänslighet eller låg assimileringseffektivitet. I sådana fall kan det vara lämpligt att förlänga den inledande utfodringsfasen länge än 14 dagar, eller överväga en högre foderkoncentration, särskilt för starkt metaboliserande ämnen. Det är dock viktigt att se till att kroppsbelastningen under upptaget hålls under den (uppskattade) kroniska nolleffektkoncentrationen (NOEC) i fiskvävnad (jfr 138).

Utsöndringsfasens varaktighet

Utsöndringsfasen varar vanligen i upp till 28 dagar, och börjar när testgruppens fiskar utfodras med rent, obehandlat foder efter upptagningsfasen. Utsöndringsfasen inleds med den första utfodringen med ”obehandlat” foder i stället för direkt efter den sista utfodringen med ”behandlat” foder, eftersom fisken kommer att fortsätta att smälta fodret och absorbera testämnet under de mellanliggande 24 timmarna, såsom anges i punkt 126. Det första provet i utsöndringsfasen tas därför kort före den andra utfodringen med obehandlat foder. Utsöndringsperioden är utformad för att fånga upp ämnen med en potentiell halveringstid på upp till 14 dagar, vilket överensstämmer med halveringstiden för bioackumulerande ämnen ([1]), så 28 dagar utgör två halveringstider för sådana ämnen. Om mycket

([1]) I en vattenexponeringsundersökning motsvarar en halveringstid på 14 dagar en BCF på cirka 10 000 l/kg med användning av fisk på 1 g med en motsvarande upptagning på omkring 500 l/kg/dag (enligt den ekvation som tagits fram av Sijm m.fl.(46)).

▼M7

bioackumulerande ämnen används kan det vara bra att förlänga utsöndringsfasen (om detta påvisas i preliminära tester).

Om ämnet utsöndras mycket långsamt så att en exakt halveringstid inte kan fastställas under utsöndringsfasen kan informationen ändå vara tillräcklig i utvärderingssyfte för att ange en hög bioackumuleringsnivå. Även det motsatta gäller, dvs. om ett ämne utsöndras så snabbt att en tillförlitlig nollkoncentration i tiden (koncentrationen i slutet av upptagningen/början på utsöndringsfasen, $C_{0,d}$) och k_2 inte kan härledas kan en konservativ uppskattning göras av k_2 (jfr tillägg 7).

Om analyser av fisken vid tidigare intervaller (t.ex. 7 eller 14 dagar) visar att ämnet har utsöndrats under kvantifieringsnivåerna innan hela 28-dagarsperioden kan provtagningen avbrytas och testet avslutas.

I ett fåtal fall kan det hända att ingen mätbar upptagning av testämnet har uppstått vid slutet av upptagningsperioden (eller i det andra utsöndringsprovet). Om det kan påvisas att i) giltighetskriteriet i punkt 113 är uppfyllt, och ii) att den bristande upptagningen inte beror på andra brister i testet (t.ex. att upptagningsfasen inte är tillräckligt lång, brister i tekniken för att behandla fodret som leder till dålig biotillgänglighet, bristande känslighet hos analysmetoden, fisken konsumerar inte fodret osv.) kan undersökningen avslutas utan att behöva göras om med en längre upptagningsfas. Om preliminärt arbete har visat att så kan vara fallet kan det vara lämpligt att analysera avföring (om det är möjligt) för osmält testämne som ett led i en massbalansmetod.

Antal testfiskar

Som i vattenexponeringstestet bör fiskar med liknande vikt och längd väljas. Den minsta fiskens vikt får inte vara mindre än minst två tredjedelar av den största fiskens vikt (jfr punkterna 40–42)

Totalt fiskantal för undersökningen bör väljas baserat på provtagningsschemat (minst ett prov i slutet av upptagningsfasen och fyra till sex prover under utsöndringsfasen, men detta beror på fasernas längd), med hänsyn till analysteknikens sensitivitet, den koncentration som sannolikt kommer att uppnås i slutet av upptagningsfasen (baserat på befintlig kunskap) och utsöndringsfasens varaktighet (om befintlig kunskap möjliggör uppskattningar). Fem till tio fiskar bör provtas varje gång. Tillväxtparametrarna (vikt och total längd) mäts före den kemiska analysen eller analysen av fetthalt.

På grund av de naturliga variationerna i storlek, tillväxttakt och fysiologi mellan fiskarna och den sannolika variationen i mängden foder som varje fisk konsumerar bör minst fem fiskar provtas i varje intervall från testgruppen och fem från kontrollgruppen för att korrekt fastställa den genomsnittliga koncentrationen och dess variabilitet. Variabiliteten mellan den använda fisken bidrar sannolikt mer till den totala okontrollerade variabiliteten i testet än de analytiska metodernas inneboende variabilitet, vilket motiverar användningen av upp till tio fiskar per provtagningspunkt i vissa fall. Om bakgrundstestämnets koncentrationer i kontrollfisken inte är mätbara i början av utsöndringsfasen är kemisk analys av två–tre kontrollfiskar i det sista provtagningsintervallet endast tillräckligt om prover tas av den återstående kontrollfisken vid samtliga kontrollpunkter för att kontrollera vikt och total längd (så att prover tas från samma antal fiskar från test- och kontrollgrupperna för att kontrollera tillväxten). Fisken lagras, vägs individuellt (även om det visar sig vara nödvändigt att kombinera provresultaten i ett senare skede) och den totala vikten mäts.

▼M7

För ett standardtest med en 28 dagar lång utsöndringsfas med fem utsöndringsprover innebär detta att det behövs sammanlagt 59–120 fiskar från testgruppen och 50–110 från kontrollgruppen, om man förutsätter att analystekniken för ämnet gör det möjligt att utföra en analys av fetthalten av samma fisk. Om analysen av fetthalt inte kan utföras på samma fisk som den kemiska analysen och det inte heller är möjligt att bara använda kontrollfisken för att analysera fetthalten (jfr punkt 56), behövs ytterligare 15 fiskar (tre från stampopulationen vid teststarten, tre var från kontroll- och testgrupperna i början av utsöndringsfasen och tre var från kontroll- och testgrupperna i slutet av försöket). Ett exempel på provtagningsschema med fiskantal finns i tillägg 4.

Fisktäthet

En liknande hög fisktäthet som för vattenexponeringsmetoden bör användas (jfr punkterna 43 och 44). Även om fisktätheten inte påverkar exponeringskoncentrationerna i testet rekommenderas en fisktäthet på 0,1–1,0 g fisk (våtvikt) per liter vatten per dag för att upprätthålla lämpliga koncentrationer löst syre och minimera stressen för testorganismerna.

Testfoder och utfodring

Under acklimatiseringsperioden bör fisken utfodras med lämpligt foder enligt beskrivningen ovan (punkt 117). Om testet utförs under genomflödesförhållanden bör flödet stängas av medan fisken utfodras.

Under testet bör det foder som ges till testgruppen följa beskrivningen ovan (punkterna 116–121). Förutom att överväga ämnesspecifika faktorer, analytisk sensitivitet, förväntad koncentration i fodret under miljöförhållanden och kroniska toxicitetsnivåer/kroppsbelastning bör man vid val av målkoncentration efter inblandning av testämnet även beakta fodrets smaklighet (så att fisken inte undviker att äta). Nominell koncentration efter inblandning av testämnet ska dokumenteras i rapporten. Baserat på tidigare erfarenhet ger koncentrationer i intervallet 1–1 000 µg/g en praktisk verkningsradie för testämnen som inte har en specifik toxisk mekanism. För ämnen som verkar via en icke-specifik mekanism bör resthalterna i vävnaden inte överstiga 5 µmol/g fett, eftersom rester över denna nivå sannolikt kommer att innebära kroniska effekter (19) (48) (50) ([1]). För andra ämnen är det viktigt att säkerställa att inga negativa effekter uppstår till följd av ackumulerad exponering (jfr punkt 127). Detta gäller särskilt om fler än ett ämne testas samtidigt (jfr punkt 112).

En lämplig mängd av testämnet ska blandas i fiskfodret. Det finns tre sätt att göra detta, som beskrivs i punkt 119 och tillägg 7. Metoderna och procedurerna för att behandla fodret ska dokumenteras i rapporten. Kontrollfisken utfodras med obehandlat foder som innehåller en motsvarande mängd av obehandlad oljevehikel om en sådan har använts i det behandlade fodret för upptagningsfasen eller om det har behandlats med ett ”rent” lösningsmedel om en lösningsmedelsvehikel har använts för beredningen av testgruppens foder. Analytiska mätningar av testämneskoncentrationen i det behandlade och obehandlade fodret bör göras i minst tre exemplar innan upptagningsfasen inleds och vid slutet av upptagningsfasen. Efter exponering för det behandlade fodret (upptagningsfasen) utfodras fisken (båda grupperna) med obehandlat foder (utsöndringsfasen).

Fisken utfodras med en fast ranson (beroende på art, t.ex. cirka 1–2 % av våtvikten per dag när det gäller regnbåge). Foderintervallerna bör väljas så att snabb tillväxt och stora ökningar av fetthalten undviks. Det exakta utfodringsintervallet

([1]) Eftersom de faktiska interna koncentrationerna inte kan bestämmas förrän testet har utförts krävs en uppskattning av den förväntade interna koncentrationen (t.ex. baserat på förväntad BMF och koncentration i fodret, jfr ekvation A5.8 i tillägg 5).

▼M7

under försöket ska registreras. I början bör utfodringen baseras på schemalagda viktmätningar av stampopulationen, som görs just före teststarten. Fodermängden bör justeras baserat på provtagningsfiskens våtvikt vid varje provtagningstillfälle för att ta hänsyn till tillväxten under försöket. Vikt och längd för fiskarna i test- och kontrolltankarna kan uppskattas från vikten och totallängden för de fiskar som används vid varje provtagningstillfälle. Återstående fisk i test- och kontrolltankarna ska inte mätas. Det är viktigt att upprätthålla samma fasta utfodringsintervall under försöket.

Utfodringen bör observeras för att se till att fisken synbart konsumerar allt foder som ges så att ett lämpligt värde för intag används i beräkningarna. Preliminära utfodringsförsök eller tidigare erfarenhet bör beaktas vid valet av utfodringsintervall för att se till att allt foder från utfodringen en gång per dag konsumeras. Om fodret konsekvent lämnas oätet kan det vara tillrådligt att sprida dosen över en extra utfodringsperiod under varje försöksdag (t.ex. ersätta utfodring en gång per dag med utfodring med halva mängden två gånger om dagen. Om detta är nödvändigt bör den andra utfodringen ske vid en fast tidpunkt och planeras så att den sker så tidigt som möjligt före provtagningen av fisken (den andra utfodringen sker t.ex. under första halvan av en försöksdag).

Även om fisken i allmänhet konsumerar fodret snabbt är det viktigt att se till att ämnet förblir adsorberat till fodret. Man bör vara noga med att undvika att testämnet sprids i vattnet från fodret, vilket gör att fisken exponeras för vattenkoncentrationer av testämnet utöver exponeringen via föda. Detta kan åstadkommas genom ett eventuellt oätet foder (och avföring) avlägsnas från test- och kontrolltankarna inom en timme efter utfodringen, men helst inom 30 minuter. Dessutom kan man använda ett system där vattnet kontinuerligt renas genom ett aktivt kolfilter för att absorbera eventuella upplösta föroreningar. Genomflödessystem kan bidra till att snabbt skölja bort foderpartiklar och upplösta ämnen ([1]). I vissa fall kan en något modifierad teknik för beredning av behandlat foder begränsa detta problem (se punkt 119).

Ljus och temperatur

Precis som för vattenexponeringsmetoden (jfr punkt 48) rekommenderas en fotoperiod på 12–16 timmar. Temperaturen (± 2 °C) bör vara lämplig för de arter som testas (jfr tillägg 3). Belysningens typ och egenskaper ska vara kända och dokumenterade.

Kontroller

En kontrollgrupp bör användas, där fisken utfordras med samma ranson som testgruppen, men utan testämne i fodret. Om en olje- eller lösningsmedelsvehikel har använts för att behandla testgruppens foder bör kontrollgruppens foder behandlas på exakt samma sätt, men utan testämnet, så att test- och kontrollgruppens foder är likvärdiga (jfr punkterna 121 och 139).

([1]) Förekomst av testämnet i testmediet till följd av fiskens avföring eller läckage från fodret kanske inte kan undvikas helt. Ett alternativ är därför att mäta ämneskoncentrationen i vattnet i slutet av upptagningsperioden, särskilt om en semistatisk utformning används, för att fastställa om vattenexponering har uppstått.

▼M7

Frekvens för mätningar av vattenkvaliteten

De betingelser som beskrivs i vattenexponeringsmetoden gäller även här, förutom att TOC endast behöver mätas före testet som ett led i karakteriseringen av testvattnet (punkt 53).

Provtagning och analys av fisk och foder

Analys av kostprover

Prover av test- och kontrollfoder bör analyseras i minst tre exemplar när det gäller testämne och fetthalt, åtminstone före början av och vid slutet av upptagningsfasen. Analysmetoder och förfaranden för att säkerställa att fodret är homogent ska anges i rapporten.

Proverna ska analyseras med avseende på testämnet med den etablerade och validerade metoden. Förberedande arbete bör utföras för att fastställa kvantifieringsgräns, återhämtning i procent, störningar och analytisk variabilitet i den avsedda provmatrisen. Om radioaktivt märkt material testas bör liknande överväganden som för vattenexponeringsmetoden göras, förutom att foderanalysen ersätter vattenanalysen (jfr punkt 65).

Analys av fisken

Vid varje provtagningstillfälle tas prover från 5–10 fiskar från exponerings- och kontrollbehandlingarna (i vissa fall kan antalet kontrollfisk minskas, jfr punkt 134).

Provtagningen bör göras vid samma tidpunkt varje försöksdag (i förhållande till utfodringstidpunkten) och bör planeras så att sannolikheten för att foder finns kvar i tarmen under upptagningsfasen och det tidiga skedet av utsöndringsfasen minimeras i syfte att undvika felaktiga bidrag till de totala testämneskoncentrationerna. (Dvs. provtagningsfisken avlägsnas i slutet av försöksdagen med tanke på att en försöksdag inleds vid utfodringstidpunkten och avslutas vid tidpunkten för nästa utfodring, omkring 24 timmar senare. Utsöndringen inleds vid den första utfodringen med obehandlat foder, jfr punkt 128.) Provet från den första utsöndringsfasen (som tas kort efter den andra utfodringen med obehandlat foder) är viktig eftersom extrapoleringen en dag tillbaka från denna mätning används för att uppskatta nollkoncentrationen i tiden ($C_{0,\ d}$, koncentrationen i fisken i slutet av upptagningsfasen/i början av utsöndringsfasen). Eventuellt kan fiskens mag-tarmkanal avlägsnas och analyseras separat i slutet av upptagningsfasen och dag 1 och 3 av utsöndringsfasen.

Fisken avlägsnas från båda testkärlen vid varje provtagningstillfälle och behandlas på samma sätt som beskrivningen i vattenexponeringsmetoden (jfr punkterna 61–63).

Koncentrationer av testämnet i hela fiskar (våtvikt) mäts åtminstone i slutet av upptagningsfasen och under utsöndringsfasen i både kontroll- och testgrupperna. Under utsöndringsfasen rekommenderas fyra till sex provtagningspunkter (t.ex. 1, 3, 7, 14 och 28 dagar). Eventuellt kan en ytterligare provtagningspunkt inbegripas efter 1–3 dagars upptagning för att uppskatta assimileringseffektiviteten från den linjära fasen av upptagningen i fisken medan den fortfarande befinner sig i början av exponeringsperioden. Det finns två viktiga avvikelser från schemat: i) om en förlängd upptagningsfas används för att undersöka upptagningskinetiken ökas antalet provtagningspunkter under upptagningsfasen, vilket innebär att mer

▼M7

fisk behövs (jfr punkt 126), och ii) om undersökningen avslutas i slutet av upptagningsfasen på grund av att det inte finns en mätbar upptagning (jfr punkt 131). Enskilda provtagningsfiskar bör vägas (och totalvikten registreras) för att kunna fastställa tillväxtkonstanterna. Koncentrationer av ämnet i specifik fiskvävnad (ätbara och icke ätbara delar) kan också mätas i slutet av upptagningsfasen och vid valda tillfällen under utsöndringsfasen. Om radioaktivt märkt material testas bör liknande överväganden som för vattenexponeringsmetoden göras, förutom att foderanalysen ersätter vattenanalysen (jfr punkt 65).

Om ett referensämne används regelbundet (jfr punkt 25) bör koncentrationerna mätas i testgruppen i slutet av upptagningsfasen och vid alla tidpunkter under utsöndringsfasen som har fastställts för testämnet (hel fisk). Koncentrationerna behöver bara analyseras i kontrollgruppen i slutet av upptagningsfasen (hel fisk). Under vissa omständigheter (t.ex. om analysteknikerna för test- och referensämnet är inkompatibla så att ytterligare fisk behövs för att följa provtagningsschemat) kan en annan metod användas enligt nedan för att minimera antalet ytterligare fiskar som behövs. Koncentrationer av referensämnet mäts endast under utsöndringsfasen, dagarna 1, 3 och vid två ytterligare provtagningspunkter som väljs så att tillförlitliga nollkoncentrationer i tiden ($C_{0,d}$) och k_2 kan göras för referensämnet.

Om möjligt bör fetthalten hos de enskilda fiskarna fastställas vid varje provtagningstillfälle, eller åtminstone i början och i slutet av upptagningsfasen och i slutet av utsöndringsfasen (jfr punkterna 56 och 67). Beroende på analytisk metod (se punkt 67 och tillägg 4) kan det vara möjligt att använda samma fisk för att fastställa både fetthalt och testämnets koncentration. Detta är att föredra för att minska antalet använd fisk. Om det inte är möjligt kan samma metod som beskrivs i vattenexponeringsmetoden användas (alternativa möjligheter att mäta fetthalten anges i punkt 56). Den metod som används för att kvantifiera fetthalten ska dokumenteras i rapporten.

Analysmetodens kvalitet

Försökskontroller bör utföras för att säkerställa den ämnesspecifika analysteknikens specificitet, noggrannhet, precision och reproducerbarhet samt återhämtning av testämnet i både foder och fisk.

Mätning av fiskens tillväxt

När testet inleds vägs ett prov av fiskar från stampopulationen och deras totallängd mäts. Fiskproverna bör tas kort före den första utfodringen med behandlat foder (t.ex. en timme) och anvisas till försöksdag 0. Antalet fiskar i detta prov bör vara minst detsamma som för proverna under testet. En del av dessa kan vara samma fisk som användes för analysen av fetthalt innan upptagningsfasens början (jfr punkt 153). Fisken vägs först och mäts sedan vid varje provtagningsintervall. Uppmätt vikt (och längd) för varje enskild fisk kopplas till den analyserade kemikaliekoncentrationen (och fetthalten i förekommande fall), t.ex. genom användning av en unik identifieringskod för varje fisk. Mätningarna av dessa provtagningsfiskar kan användas för att uppskatta vikt (och längd) för den fisk som är kvar i testet och kontrolltankarna.

Försöksutvärdering

Observationer av dödlighet ska göras och registreras dagligen. Ytterligare observationer av eventuella negativa effekter ska utföras, t.ex. onormalt beteende eller pigmentering. Resultaten ska registreras. Fisken anses död om den inte har några andningsrörelser och inte reagerar på svag mekanisk retning. Död eller tydligt döende fisk ska avlägsnas.

▼M7

DATA OCH RAPPORTERING

Behandling av resultaten

Testresultaten används för att härleda utsöndringskonstanten (k_2) som en funktion av fiskens totala våtvikt. Tillväxtkonstanten, k_g, baserad på den genomsnittliga ökningen av fiskens vikt, beräknas och används i förekommande fall för att få fram en tillväxtkorrigerad utsöndringskonstant, k_{2g}. Dessutom ska assimileringseffektivitet (a, absorption från tarmen), kinetisk biomagnifikationsfaktor (BMF_K) (vid behov tillväxtkorrigerad, BMF_{Kg}), dess värde korrigerat för fetthalt (BMF_{KL} eller BMF_{KgL}, vid korrigering för utspädning på grund av tillväxt) samt utfodringsintervall redovisas. Om en uppskattning av tid till stabilt tillstånd i upptagningsfasen kan göras (t.ex. 95 % av stabilt tillstånd eller $t_{95} = 3{,}0/k_2$), kan en uppskattning av BMF i stabilt tillstånd (BMF_{SS}) inbegripas (jfr punkterna 105 och 106 samt tillägg 5) om värdet t_{95} visar att förhållanden för stabilt tillstånd kan ha uppnåtts. Samma korrigering för fetthalt bör tillämpas på denna BMF_{SS} som för den kinetiskt härledda BMF (BMF_K) för att få fram ett värde korrigerat för fetthalt, BMF_{SSL} (observera att det inte finns ett vedertaget förfarande för att korrigera en stabil BMF för utspädning på grund av tillväxt). Formler och exempelberäkningar finns i tillägg 7. Det finns metoder som gör det möjligt att uppskatta en kinetisk biokoncentrationsfaktor (BCF_K) från de data som genereras i testet med exponering via föda. Detta diskuteras i tillägg 8.

Uppgifter om fiskens vikt/längd

Våtvikt och längder för enskilda fiskar för alla tidsperioder anges i separata tabeller för test- och kontrollgrupperna för alla provtagningsdagar under upptagningsfasen (stampopulationen för upptagningsfasens start, kontroll- och testgruppen för slutet av upptagningsperioden och, om den utförs, för den tidiga fasen (t.ex. dag 1–3 för upptagningsfasen) och utsöndringsfasen (t.ex. dagarna 1, 2, 4, 7, 14 och 28 för kontroll- och testgruppen). Vikt är det lämpligaste måttet för korrigeringar av utspädning på grund av tillväxt. De metoder som används för att korrigera data för utspädning på grund av tillväxt beskrivs nedan (se punkterna 162 och 163 samt tillägg 5).

Data om testämnets koncentration i fisken

Mätningar av rester av testämnet hos enskilda fiskar (eller sammanslagna fiskprover om individuella fiskmätningar inte är möjliga), uttryckt i våtviktskoncentration (massförhållande) ställs upp i tabellform för test- och kontrollfisken för de olika provtagningstillfällena. Om en analys av fetthalt har utförts av varje provtagningsfisk kan individuella koncentrationer korrigerade för fetthalt, i form av fettkoncentration (massförhållande, fett), härledas och ställas upp i tabellform.

— Mätningar av rester av testämnet hos enskilda fiskar (eller sammanslagna fiskprover om individuella fiskmätningar inte är möjliga, jfr punkt 66) för utsöndringsperioden konverteras till sina naturliga logaritmer och avsätts mot tiden (dag). Om en visuell inspektion av diagrammet visar uppenbara avvikande värden kan ett statistiskt giltigt test för avvikande värden tillämpas för att avlägsna felaktiga datapunkter. Uteslutandet av dessa värden ska dokumenteras och motiveras.

— En linjär korrelation med minsta kvadratmetoden beräknas för ln(koncentration) som funktion av utsöndringsdata (dag). Linjens lutning och skärningspunkt redovisas som total utsöndringskonstant (k_2) och som den naturliga logaritmen för den härledda nollkoncentrationen i tid ($C_{0,d}$) (jfr tilläggen 5 och 7 för en närmare beskrivning). Om detta inte är möjligt på grund av att koncentrationerna faller under kvantifieringsgränsen för det andra utsöndringsprovet kan en konservativ uppskattning av k_2 göras (jfr tillägg 7).

— Varianserna i linjens lutning och skärningspunkt beräknas med statistiska standardförfaranden och konfidensintervallerna 90 % (eller 95 %) runt dessa resultat utvärderas och redovisas.

▼M7

— Genomsnittlig uppmätt fiskkoncentration för den sista dagen i upptagningsfasen (uppmätt nollkoncentration i tiden, $C_{0,m}$) beräknas också och jämförs med det härledda värdet $C_{0,d}$. Om det härledda värdet är lägre än det uppmätta värdet kan skillnaden tyda på förekomst av osmält behandlat foder i tarmen. Om det härledda värdet är mycket högre än det uppmätta värdet kan det tyda på att det värde som härletts från den linjära regressionen av utsöndringsdata är felaktigt och bör omvärderas (se tillägg 7).

Utsöndringskonstant och biomagnifikationsfaktor

För att beräkna biomagnifikationsfaktorn från sina data måste man först få fram assimileringseffektiviteten (absorption av testämnet genom tarmen, α). Ekvation A7.1 i tillägg 7 används för detta. Härledd koncentration i fisken vid tidpunkten noll i utsöndringsfasen ($C_{0,d}$), (total) utsöndringskonstant (k_2), koncentration i fodret (C_{food}), foderintagskonstant (I) och upptagningsperiodens varaktighet (t) vara kända. Lutningen och skärningspunkten i det linjära förhållandet mellan In(koncentration) och utsöndringstid redovisas som total utsöndringskonstant (k_2 = lutning) och nollkoncentration i tid ($C_{0,d} = e^{intercept}$), enligt ovan. De härledda värdena ska kontrolleras med avseende på biologisk rimlighet (t.ex. assimileringseffektivitet som en fraktion är inte större än 1). (I) beräknas genom att fodermassan divideras med den fiskmassa som utfodras varje dag (vid utfodring av 2 % av kroppsvikten blir (I) 0,02). Det utfodringsintervall som används i beräkningen kan dock behöva justeras för fiskens tillväxt (detta kan göras genom att man använder den kända tillväxtkonstanten för att uppskatta fiskens vikt vid varje tidpunkt under upptagningsfasen (jfr tillägg 7). Om k_2 och $C_{0,d}$ inte kan härledas för att koncentrationerna t.ex. faller under detektionsgränsen för det andra utsöndringsprovet kan en konservativ uppskattning av k_2 och en BMF_k med en övre gräns göras (jfr tillägg 7).

När man väl har fått fram assimileringseffektiviteten (α) kan biomagnifikationsfaktorn beräknas genom att α multipliceras med foderintagskonstanten (I) och divideras med den (totala) utsöndringskonstanten (k_2). Den tillväxtkorrigerade biomagnifikationsfaktorn beräknas på samma sätt, men med användning av den tillväxtkorrigerade utsöndringskonstanten (k_{2g}, jfr punkterna 162 och 163. En alternativ uppskattning av assimileringseffektiviteten kan härledas om en vävnadsanalys har gjorts av fisk som provtagits i den tidiga, linjära fasen av upptagningsfasen, jfr punkt 151 och tillägg 7. Detta värde utgör en oberoende uppskattning av assimileringseffektiviteten för en i huvudsak oexponerad organism (dvs. fisken befinner sig i början av upptagningsfasen). Assimileringseffektivitet uppskattad från utsöndringsdata används vanligen för att härleda BMF.

Korrigering för fetthalt och korrigering för utspädning på grund av tillväxt

Fiskens tillväxt under utsöndringsfasen kan sänka de uppmätta kemikaliska koncentrationerna i fisken, vilket leder till att den totala utsöndringskonstanten, k_2, är högre än den skulle vara på grund av enbart elimineringsprocesser (t.ex. metabolism, egestion) (jfr punkt 72). Testfiskens fetthalt (som är starkt kopplad till bioackumulering av hydrofoba ämnen) och fodrets fetthalt kan i praktiken variera så mycket att värdena måste korrigeras för att biomagnifikationsfaktorer ska kunna presenteras på ett meningsfullt sätt. Biomagnifikationsfaktorn bör korrigeras för utspädning på grund av tillväxt (som kinetisk BCF i vattenexponeringsmetoden) och korrigeras för fodrets fetthalt jämfört med fiskens fetthalt (korrigeringsfaktor för fetthalt). Ekvationer och exempel på sådana beräkningar finns i tillägg 5 respektive tillägg 7.

För att korrigera för utspädning på grund av tillväxt ska den tillväxtkorrigerade utsöndringskonstanten (k_{2g}) beräknas (se ekvationer i tillägg 5). Denna tillväxtkorrigerade utsöndringskonstant (k_{2g}) används sedan för att beräkna den tillväxtkorrigerade biomagnifikationsfaktorn, som i punkt 73. I vissa fall är detta tillvägagångssätt inte möjligt. Ett alternativt tillvägagångssätt som undviker behovet

▼M7

av korrigering för utspädning på grund av tillväxt är att använda utsöndringsdata för massa av testämne per fisk (hela fiskar) i stället för koncentrationsdata för massa av testämne per enhetsmassa av fisk, vilket är det vanliga. Detta är enkelt att åstadkomma eftersom testerna enligt denna testmetod bör koppla registrerade vävnadskoncentrationer till enskilda fiskars längd. Det enkla förfarandet för att göra detta beskrivs i tillägg 5. Observera att k_2 fortfarande ska uppskattas och rapporteras även om detta alternativa tillvägagångssätt används.

För att korrigera för fetthalt i fodret och när en analys av fetthalten inte har utförts på all provtagningsfisk härleds de genomsnittliga fettfraktionerna (massförhållande) i fisken och i fodret ([1]). Därefter beräknas korrigeringsfaktorn för fetthalt (L_c) genom att fiskens genomsnittliga fettfraktion divideras med fodrets genomsnittliga fettfraktion. Biomagnifikationsfaktorn, tillväxtkorrigerad eller ej, divideras med korrigeringsfaktorn för fetthalt för att beräkna biomagnifikationsfaktorn korrigerad för fetthalt.

Om kemiska analyser och analyser av fetthalt har utförts på samma fisk vid varje provtagningstillfälle kan vävnadsdata korrigerade för fetthalt för enskilda fiskar användas för att direkt beräkna en BMF korrigerad för fetthalt (jfr (37)). Diagrammet för koncentrationsdata korrigerade för fetthalt ger $C_{0,d}$ baserat på fetthalt och k_2. Därefter kan den matematiska analysen fortsätta med användning av samma ekvationer i tillägg 7, men assimileringseffektiviteten (*a*) beräknas med hjälp av foderintagskonstanten normaliserad för fetthalt (I_{lipid}) och foderkoncentrationen baserat på fetthalt ($C_{food\text{-}lipid}$). Parametrar korrigerade för fetthalt används sedan på ett liknande sätt för att beräkna BMF (observera att även korrigering av tillväxtkonstanten ska tillämpas på fettfraktionen i stället för fiskens våtvikt för att beräkna BMF_{KgL} korrigerad för fetthalt och tillväxt).

Tolkning av resultaten

Den genomsnittliga tillväxten i både test- och kontrollgrupperna ska i princip inte skilja sig nämnvärt för att utesluta toxiska effekter. De två gruppernas tillväxtkonstanter eller tillväxtkurvor bör jämföras med ett lämpligt förfarande ([2]).

Testrapport

När undersökningen har avslutats utarbetas en slutlig rapport med information om testämne, testarter och testbetingelser enligt punkt 81 (som för metoden med exponering via vatten). Därutöver krävs följande information:

Testämne:

— Eventuell information om testämnets stabilitet i det beredda fodret.

([1]) Denna metod är specifik för testet med exponering via föda och skiljer sig från det förfarande som används vid exponering via vatten. För att undvika förvirring har därför begreppet ”korrigering” använts i stället för ”normalisering” – se även fotnot i piunkt 106.

([2]) Ett t-test av tillväxtkonstanterna kan utföras för att undersöka om tillväxten skiljer sig mellan kontroll- och testgrupperna, eller ett F-test om man analyserar variansen. Vid behov kan ett F-test eller sannolikhetsförhållandet användas som underlag för valet av lämplig tillväxtmodell (OECD monograph 54, (32).

▼M7

Testbetingelser:

— Ämnets nominella koncentration i fodret, inblandningsteknik, mängd (fett)vehikel som använts när fodret blandas med testämnet (i förekommande fall), mätningar av testämnets koncentration i det behandlade fodret för varje analys (åtminstone i tre exemplar, innan undersökningen inleds och i slutet av upptagningsfasen) samt medelvärden.

— Om en bärarolja eller ett bärarlösningsmedel har använts för att behandla fodret, typ och kvalitet (grad, leverantör osv.)

— Använd fodertyp (ungefärlig analys [1]), grad eller kvalitet, leverantör osv), utfodringsintervall under upptagningsfasen, administrerad fodermängd och frekvens (inklusive eventuella justeringar baserat på provtagningsfiskens vikt).

— Den tidpunkt då fisken samlades in och avlivades för kemisk analys för varje provtagningspunkt (t.ex. en timme innan följande dags utfodring).

Resultat:

— Resultat från eventuell preliminär undersökning.

— Information om eventuella observerade negativa effekter.

— Fullständig beskrivning av alla kemiska analysförfaranden, inklusive detektions- och kvantifieringsgränser, variabilitet och återhämtning.

— Uppmätta fettkoncentrationer i fodret (behandlat foder och kontrollfoder), individuella värden, medelvärden och standardavvikelser.

— Data i tabellform om fiskens vikt (och längd), kopplade till enskilda fiskar för både kontroll- och exponeringsgrupperna (t.ex. med användning av unik identifiering av varje fisk) samt beräkningar, härledda tillväxtkonstanter och 95 % konfidensintervall.

— Data i tabellform om testämnets koncentrationer i fisken, genomsnittlig uppmätt koncentration i slutet av upptagningsfasen ($C_{0,m}$) och härledd (total) utsöndringskonstant (k_2) samt koncentration i fisken i början av utsöndringsfasen ($C_{0,d}$), tillsammans med varianserna i dessa värden (lutning och skärningspunkt).

— Data i tabellform om fiskens fetthalt (listad mot specifika ämneskoncentrationer i förekommande fall), medelvärden för test- och kontrollgruppen vid teststarten, i slutet av upptagningsfasen och i slutet av utsöndringsfasen.

— Kurvor (med alla uppmätta data) som visar följande (i förekommande fall kan koncentrationerna uttryckas i förhållande till hela kroppen eller specifika vävnader.

  — Tillväxt (dvs. fiskens vikt (och längd) som funktion av tiden) eller den naturliga logaritmen av vikten som funktion av tiden.

[1] En foderanalysteknik för protein- och fetthalt samt innehåll av råfibrer och aska. Denna information finns vanligen tillgänglig från foderleverantören.

▼M7

— Testämnets utsöndring i fisken.

— Den naturliga logaritmen av koncentrationen (ln-koncentration) som funktion av utsöndringstiden (inklusive den härledda upptagningskonstanten k_2 och koncentration i fisken i början av utsöndringsfasen härledd med en naturlig logaritm, $C_{0,d}$).

— Om en visuell inspektion av ett diagram visar uppenbara avvikande värden kan ett statistiskt giltigt test för avvikande värden tillämpas för att avlägsna felaktiga datapunkter. Uteslutandet av dessa värden ska dokumenteras och motiveras.

— Beräknad tillväxtkorrigerad utsöndringskonstant och tillväxtkorrigerad halveringstid.

— Beräknad assimiliseringseffektivitet (α).

— ”Rå” BMF för födotest, kinetisk BMF som korrigerats för fetthalt och utspädning på grund av tillväxt (”rå” och korrigerad för fetthalt baserat på hela fiskars vikt) samt vävnadsspecifik BMF i förekommande fall.

— Eventuell information om metaboliter från radioaktivt märkta testämnen och metaboliternas ackumulation.

— Eventuella anmärkningar avseende undersökning, eventuell avvikelse från förfarandet och annan relevant information.

— En sammanfattning av relevanta uppmätta och beräknade data, enligt följande:

Utsöndringskonstanter för ämnet samt biomagnifikationsfaktorer (BMF_K)	
k_g (tillväxtkonstant, dag^{-1}):	Insatsvärde (95 % CI) (1)
k_2 (total utsöndringskonstant, dag^{-1}):	Insatsvärde (95 % CI)
k_{2g} (tillväxtkorrigerad utsöndringskonstant, dag^{-1}):	Insatsvärde (95 % CI) (1)
$C_{0,m}$ (uppmätt nollkoncentration i tid, koncentrationen i fisken i slutet av upptagningsfasen) (µg/g):	Insatsvärde ± SD (2)
$C_{0,d}$ (härledd nollkoncentration i tid för utsöndringsfasen, µg/g):	Insatsvärde ± SD (2)
I (fastställt värde för intag, g foder/g fisk/dag):	Insatsvärde
I_g (effektivt foderintervall, justerat för tillväxt, g foder/g fisk/dag) (2):	Insatsvärde ± SD (2)
C_{food} (kemisk koncentration i fodret, µg/g):	Insatsvärde ± SD (2)
α (ämnets assimileringseffektivitet):	Insatsvärde ± SD (2)
BMF_K kinetisk BMF för födotest):	Insatsvärde (95 % CI) (1)
BMF_{Kg} (tillväxtkorrigerad kinetisk BMF för födotest):	Insatsvärde (95 % CI) (1)

▼M7

Utsöndringskonstanter för ämnet samt biomagnifikationsfaktorer (BMF_K)	
$t_{1/2g}$ (tillväxtkorrigerad halveringstid i dagar):	Insatsvärde ± SD ([2])
Lc (korrigeringsfaktor för fetthalt):	Insatsvärde
BMF_{KgL} (kinetisk BMF korrigerad för fetthalt och tillväxt):	Insatsvärde
$BMF_{SS\text{-}L}$ (indikativ stabil BMF korrigerad för fetthalt) ([2]):	Insatsvärde ± SD ([2])

([1]) CI: konfidensintervall (om en uppskattning är möjlig)
([2]) SD: Standardavvikelse (om en uppskattning är möjlig)

LITTERATUR

(1) Kapitel C.13 i denna bilaga, *Biokoncentration: Genomflödesprovning med fisk*.

(2) Kapitel A.6 i denna bilaga, *Vattenlöslighet*

(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) Kapitel A.8 i denna bilaga, *Fördelningskoefficient (n-oktanol/vatten): skakkolvmetoden*.

(5) Kapitel A.24 i denna bilaga, *Fördelningskoefficient (n-oktanol/vatten), HPLC-metoden*.

(6) Kapitel A.23 i denna bilaga, *Fördelningskoefficient (n-oktanol/vatten): metod med långsam omrörning*.

(7) Kapitel C.7 i denna bilaga, *Hydrolys som funktion av 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) Kapitel A.5 i denna bilaga, *Ytspänning i vattenlösningar*.

(10) Kapitel A.4 i denna bilaga, *Ångtryck*.

(11) Kapitel C.4 i denna bilaga, *Bestämning av "lätt" bionedbrytbarhet*.

(12) Kapitel C.29 i denna bilaga, *Lätt bionedbrytbarhet – CO_2 i förslutna kärl*

(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) Kapitel C.47 i denna bilaga, *Toxicitetstest på fisk i tidiga levnadsstadier*.

(23) Kapitel C.15 i denna bilaga, *Fisk, korttidstest avseende toxicitet på embryo- och säckyngelstadierna*

(24) Kapitel C.14 i denna bilaga, *Tillväxttest på unga exemplar av fisk*.

(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

Tillägg 1

DEFINITIONER OCH ENHETER

Assimileringseffektivitet (α) är ett mått på den relativa mängd av ämnet som absorberas från tarmen in i organismen (α har ingen enhet, men uttrycks ofta som procentandel i stället för fraktion).

Bioackumulering avser vanligen en process där ämneskoncentrationen i en organism når en nivå som är högre än nivån i andningsmediet (t.ex. vatten för fisk eller luft för ett däggdjur), i födan eller i båda (1).

Biokoncentrationen är ökningen av koncentrationen av det undersökta ämnet i eller på en organism (specificerad vävnad därav) i förhållande till koncentrationen av det undersökta ämnet i omgivande medium.

Biokoncentrationsfaktorn (BCF eller K_B) vid varje tidpunkt under upptagningsfasen av ackumulationsprovet är det undersökta ämnets koncentration i/på fisken eller den specificerade vävnaden därav (C_f as mg/kg), dividerat med ämnets koncentration i omgivande medium (C_w i mg/l). BCF uttrycks som $l \cdot kg^{-1}$. Observera att korrigeringarna för tillväxt och/eller standardfetthalt inte är medräknade.

Biomagnifikation är ökningen av koncentrationen av det undersökta ämnet i eller på en organism (specificerad vävnad därav) i förhållande till koncentrationen av det undersökta ämnet i fodret.

Biomagnifikationsfaktorn (BMF) är koncentrationen av ett ämne i en predator i förhållande till dess byte (eller foder) i stabilt tillstånd. I den metod som beskrivs i denna testmetod undviks exponering via vattenfasen noggrant, vilket innebär att ett BMF-värde från detta test inte kan jämföras direkt med ett BMF-värde från en fältstudie (där både exponering via vatten och föda kan kombineras).

Biomagnifikationsfaktor för test med exponering via föda (BMF för födotest) är den term som används i denna testmetod för att beskriva resultatet av kostexponeringstestet, där exponering via vattenfasen undviks noggrant. Det innebär att BMF för födotest från denna testmetod inte kan jämföras direkt med ett BMF-värde från en fältstudie (där både exponering via vatten och föda kan kombineras),

Utsöndrings- eller efterexponeringsfasen (förlustfasen) är den period, efter det att den undersökta fisken flyttats från ett medium innehållande det undersökta ämnet till ett medium fritt från detta ämne, under vilken utsöndringen (eller nettoförlusten) av det aktuella ämnet från den undersökta fisken eller specificerad vävnad därav studeras.

Utsöndringskonstanten (förlustkonstanten) (k_2) är det numeriska värdet för minskningshastigheten av koncentrationen av det undersökta ämnet i den undersökta fisken eller i specificerad vävnad därav, efter överföring av den undersökta fisken från ett medium innehållande det undersökta ämnet till ett medium fritt från detta ämne (k_2 uttrycks som dag^{-1}).

Löst organiskt kol (DOC) är ett mått på koncentrationen av kol som härrör från upplösta organiska källor i testmediet.

Exponerings- eller upptagningsfasen är den tid under vilken fisken exponeras för testämnet.

Foderintagskonstanten (*I*) är den genomsnittliga mängd foder som varje fisk äter varje dag, i förhållande till uppskattad genomsnittlig helfisksvikt (uttryckt i foder/g fisk/dag).

▼M7

Kinetisk biokoncentrationsfaktor (BCF_K) är förhållandet mellan upptagningskonstanten, k_1, och utsöndringskonstanten, k_2 (dvs. k_1/k_2 – se motsvarande definitioner i denna bilaga). Detta värde bör i princip vara jämförbart med BCF_{SS} (se definition ovan), men avvikelser kan förekomma om det stabila tillståndet var osäkert eller om tillväxtkorrigeringar har tillämpats på den kinetiska BCF.

Kinetisk biokoncentrationsfaktor normaliserad för fetthalt (BCF_{KL}) normaliseras till en fisk med 5 % fetthalt.

Kinetisk biokoncentrationsfaktor normaliserad för fetthalt och korrigerad för tillväxt (BCF_{KgL}) normaliseras till en fisk med 5 % fetthalt och korrigeras för tillväxt under undersökningsperioden enligt beskrivningen i tillägg 5.

Kinetisk biokoncentrationsfaktor i stabilt tillstånd normaliserad för fetthalt (BCF_{SSL}) normaliseras till en fisk med 5 % fetthalt.

Ett multikomponentämne definieras i Reach som ett ämne där fler än en huvudsaklig beståndsdel förekommer i en koncentration på 10–80 viktprocent.

Fördelningskoefficient oktanol/vatten (K_{OW}) är förhållandet då ämnets lösbarhet i n-oktanol och vatten når balans (A.8 (2), A.24 (3), A.23 (4)), uttrycks även som P_{OW}. Logaritmen för K_{OW} används som en indikation på ämnets potential för biokoncentration i vattenorganismer.

Partikulärt organiskt kol (POC) är ett mått på koncentrationen av kol som härrör från suspenderade organiska källor i testmediet.

Mikroextraktion i fastfas (SPME) är en analytisk metod utan lösningsmedel som har utvecklats för utspädningssystem. I denna metod exponeras en polymertäckt fiber för gas- eller vätskefasen som innehåller analyten av intresse. Normalt används en minsta analystid så att jämviktsförhållanden etableras mellan de fasta och flytande faserna, med hänsyn till de mätta arterna. Därefter kan koncentrationen av analyten av intresse bestämmas direkt från fibern eller efter det att den extraherats från fibern till ett lösningsmedel, beroende på bestämningsteknik.

Stabilt tillstånd nås när mängden undersökt ämne i fisk (C_f) i den tidpunkt där kurvan blir parallell med tidsaxeln och tre på varandra följande C_f-analyser, på prover tagna med intervaller på minst två dagar, ligger inom ± 20 % på de tre proverna och ingen signifikant ökning av C_f förekommer under tiden mellan den första och den sista successiva analysen. När kombinerade prover analyseras krävs minst fyra på varandra följande analyser. När de undersökta ämnena tas upp långsamt bör provtagningsintervallerna vara sju dagar.

Den stabila biokoncentrationsfaktorn (BCF_{SS}) genomgår ingen väsentlig förändring under en längre tidsperiod, om koncentrationen av det undersökta ämnet i omgivande medium är konstant under denna tidsperiod (jfr definition av stabilt tillstånd).

Totalt organiskt kol (TOC) är ett mått på koncentrationen av kol som härrör från alla organiska källor i testmediet, inklusive partiklar och upplösta källor.

Konstanten för upptagningsförhållandet (k_1) är det numeriska värde som definierar ökningshastigheten av koncentrationen av det undersökta ämnet i/på den undersökta fisken eller specificerad vävnad därav, när fisken exponeras för nämnda ämne (k_1 uttrycks som l kg^{-1} dag^{-1}).

Ämnen med okänd eller varierande sammansättning, komplexa reaktionsprodukter eller biologiskt material benämns UVCB-ämnen.

▼**M7**

Kemikalie: ett ämne eller en blandning.

Testkemikalie: varje ämne eller blandning som testas med denna testmetod.

LITTERATUR

(1) Gobas F.A.P.C., de Wolf W., Burkhard L.P., Verbruggen E. och Plotzke K. (2009), Revisiting bioaccumulation criteria for POPs and PBT assessments. Integr. Environ. Assess. Manag. 5: 624–637.

(2) Kapitel A.8 i denna bilaga, *Fördelningskoefficient (n-oktanol/vatten): Skakkolvmetoden*

(3) Kapitel A.24 i denna bilaga, *Fördelningskoefficient (n-oktanol/vatten), Vätskekromatografimetoden (HPLC)*.

(4) Kapitel A.23 i denna bilaga, *fördelningskoefficient (1-oktanol/vatten): Metod med långsam omrörning*.

▼M7

Tillägg 2

TESTBETINGELSER, TESTPERIOD OCH ÖVERLEVNADSKRITERIER FÖR REKOMMENDERADE ARTER

Komponent	Koncentrations-gränsvärde
Partiklar	5 mg/l
Halt av organiskt kol	2 mg/l
Icke-joniserad ammoniak	1 µg/l
Resterande mängd klor	10 µg/l
Total mängd bekämpningsmedel som innehåller organiska fosforföreningar	< 50 ng/l
Total mängd bekämpningsmedel som innehåller organiska klorföreningar plus polyklorerade bifenyler	< 50 ng/l
Total mängd organiskt klor	< 25 ng/l
Aluminium	1 µg/l
Arsenik	1 µg/l
Krom	1 µg/l
Kobolt	1 µg/l
Koppar	1 µg/l
Järn	1 µg/l
Bly	1 µg/l
Nickel	1 µg/l
Zink	1 µg/l
Kadmium	< 100 ng/l
Kvicksilver	< 100 ng/l
Silver	< 100 ng/l

▼M7

Tillägg 3

FISKARTER SOM REKOMMENDERAS FÖR TESTNING

Rekommenderade arter	Rekommenderat temperaturområde för undersökningen (°C)	Rekommenderad total längd på det undersökta djuret (cm) (2)
Danio rerio (1) (Teleostei, Cyprinidae) (Hamilton-Buchanan) Sebrafisk	20–25	3,0 ± 0,5
Pimephales promelas (Teleostei, Cyprinidae) (Rafinesque) Knölskallelöja	20–25	5,0 ± 2,0
Cyprinus carpio (Teleostei, Cyprinidae) (Linnaeus) Karp	20–25	8,0 ± 4,0 (3)
Oryzias latipes (Teleostei, Poecilliidae) (Temminck och Schlegel) Risfisk	20–25	4,0 ± 1,0
Poecilia reticulata (Teleostei, Poeciliidae) (Peters) Guppy	20–25	3,0 ± 1,0
Lepomis macrochirus (Teleostei, Centrarchidae) (Rafinesque) Blågälad solabborre	20–25	5,0 ± 2,0
Oncorhynchus mykiss (Teleostei, Salmonidae) (Walbaum) Regnbåge	13–17	8,0 ± 4,0
Gasteroteus aculeatus (Teleostei, (Gasterosteidae) (Linnaeus) Storspigg	18–20	3,0 ± 1,0

(1) Meyer *m.fl.* (1)

(2) Det bör noteras att i själva testet är vikt att föredra som mått för att härleda storlek och tillväxtkonstanter. Längd är dock ett mer praktiskt mått om fisken väljs på avstånd i början av försöket (dvs. från stampopulationen).

(3) Detta längdintervall anges i testningsmetoder för nya kemiska ämnen osv., baserat på Japans lag om kontroll av kemiska ämnen (CSCL).

Flera söt- och saltvattenarter har använts i mindre utsträckning, t.ex.

Slätkväkare	(*Leiostomus xanthurus*)
Sheepshead minnow (art i ordningen tandkarpar)	(*Cyprinodon variegatus*)
Silverlax	(*Menidia beryllina*)
Abborre	(*Cymatogaster aggregata*)
Sjötunga	(*Parophrys vetulus*)
Staghorn sculpin (art i familjen simpor)	(*Leptocottus armatus*)
Storspigg	(*Gasterosteus aculeatus*)
Havsabborre	(*Dicentracus labrax*)
Löja	(*Alburnus alburnus*)

▼**M7**

Den sötvattenfisk som anges i ovanstående tabell är lätt att skaffa och/eller finns lätt tillgänglig under hela året, medan tillgängligheten for havs- och brackvattenarterna delvis är begränsad till respektive länder. De kan födas upp och odlas på fiskodlingar eller laboratorier under sjukdoms- och parasitkontrollerade förhållanden, så att det använda djuret är friskt och har känd stamtavla. Dessa fiskar finns tillgängliga i stora delar av världen.

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

Tillägg 4

PROVTAGNINGSSCHEMAN FÖR TEST MED EXPONERING VIA VATTEN OCH FÖDA

1 **Teoretiskt exempel på ett provtagningsschema för ett fullständigt biokoncentrationstest av ett ämne via vattenexponering med log K_{OW} = 4.**

Provtagning av fisk	Tidsschema för provtagning		Antal vattenprover (1)	Antal fiskar per prov (1)
	Längsta tänkbara provtagningsfrekvens (dagar) (2)	Tilläggsprover (dagar) (2)		
Upptagningsfas				
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))
Utsöndringsfas				Flytta över fisken till vatten som är fritt från testämnet
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))
TOTALT				40–72 (48–80) (5)

(1) Värden inom parentes står för antal prover (vatten, fisk) som ska tas om tilläggsprovtagning görs.
(2) Föregående uppskattning för k_2, för log K_{OW} på 4,0 är 0,652 dagar^{-1}. Försökets totala varaktighet är fastställd till 3 × t_{SS} = 3 × 4,6 dagar, dvs. 14 dagar. För uppskattning av t_{SS}, se tillägg 5.
(3) Ta prover på vattnet när minst tre kärlvolymer har levererats.
(4) Dessa fiskar provtas från stampopulationen.
(5) Om större precision eller metabolismstudier är nödvändiga som kräver användning av fler fiskar, bör dessa fiskar särskilt provtas i slutet av upptagnings- och utsöndringsfaserna (jfr punkt 40).
(6) Minst tre ytterligare fiskar kan krävas för analysen av fetthalt om det inte är möjligt att använda samma provtagningsfisk som för ämneskoncentrationerna i början av testet, i slutet av upptagningsfasen och i slutet av utsöndringsfasen. Observera att det i många fall är möjligt att använda endast tre kontrollfiskar (jfr punkt 56).

▼M7

2. **Teoretiskt exempel på ett provtagningsschema för ett bioackumuleringstest av ett ämne via föda efter en upptagningsfas på 10 dagar och en utsöndringsfas på 42 dagar.**

Provtagningshändelse	Tidsschema för provtagning		Antal foderprover	Antal fiskar per prov	
	Dag i fasen	Ytterligare fiskprover?		Testgrupp	Kontrollgrupp
Upptagningsfas					
1	0	Möjlig (1) (2)	3 – testgrupp	0	5–10
			3 – kontrollgrupp (1)		(8–13) (2)
1A (3)	1–3			5–10	5–10
2	10	Ja (4)	3 – testgrupp	10–15 (4)	5–10
			3 – kontrollgrupp (1)	(13–18) (5)	(8–13) (5)
Utsöndringsfas					
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)
TOTALT				59–120 (63–126) (4) (5)	50–110 (56–116) (4) (5)

(1) Tre foderprover från både kontroll- och testgrupperna analyseras med avseende på testämneskoncentrationer och fetthalt.
(2) Provtagningsfisk tas från stampopulationen, vilket ska ske så sent som möjligt innan undersökningen inleds. Minst tre fiskar från stampopulationen vid teststarten ska provtas med avseende på fetthalt.
(3) (Valfri) provtagning tidigt under upptagningsfasen ger data för beräkningen av testämnets upptag via födan. Dessa data kan jämföras med den upptagningseffektivitet som har beräknats på grundval av data från utsöndringsfasen.
(4) Fem extra fiskar kan provtas för en vävnadsspecifik analys.
(5) Minst tre ytterligare fiskar kan krävas för analysen av fetthalt om det inte är möjligt att använda samma provtagningsfisk som för ämneskoncentrationerna i början av testet, i slutet av upptagningsfasen och i slutet av utsöndringsfasen. Observera att det i många fall är möjligt att använda endast tre kontrollfiskar (jfr punkterna 56 och 153).

Anmärkning om tidpunkter för de olika faserna samt provtagning: Upptagningsfasen inleds med den första utfodringen med behandlat foder. En försöksdag löper från en utfodring till kort före nästa utfodring, 24 timmar senare. Det första provtagningstillfället (1 i tabellen) bör utföras kort före den första utfodringen (t.ex. en timme). Provtagningen bör helst utföras kort före följande dags utfodring (dvs. cirka 23 timmar efter provdagens utfodring). Upptagningsfasen slutar kort före den första utfodringen med behandlat foder, när utsöndringsfasen börjar (testgruppens fiskar håller sannolikt fortfarande på att smälta det behandlade fodret under de mellanliggande 24 timmarna efter den sista utfodringen med behandlat foder). Detta innebär att provet i slutet av upptagningsfasen bör tas kort före den första utfodringen med obehandlat foder. Det första provet under utsöndringsfasen bör tas cirka 23 timmar efter den första utfodringen med obehandlat foder.

▼M7

Tillägg 5

ALLMÄNNA BERÄKNINGAR

1. Inledning

2. Prediktion av upptagningsfasens längd

3. Prediktion av utsöndringsfasens längd

4. Stegvis metod: bestämning av utsöndringskonstanten (förlust) k_2

5. Stegvis metod: bestämning av upptagningskonstanten k1 (endast vattenexponeringsmetoden)

6. Samtidig metod för beräkning av upptagningskonstanten och utsöndringskonstanten (förlust) (endast vattenexponeringsmetoden)

7. Korrigering av utspädning för kinetisk BCF och BMF

8. Normalisering av fetthalten till 5 % (endast vattenexponeringsmetoden)

1. INLEDNING

Den allmänna modellen för bioackumulering i vatten kan beskrivas i form av upptagnings- och förlustprocesser, utan hänsyn till upptagning via föda. Den differentialekvation (dC_f/dt) som beskriver förändringshastigheten för koncentrationen i fisk (mg · kg^{-1}·dag^{-1}) anges med (1):

$$\frac{dC_f}{dt} = k_1 \times C_w - (k_2 + k_g + k_m + k_e) \times C_f \qquad \text{[Ekvation A5.1]}$$

där

k_1 = första ordningens konstant för upptagning i fisk (l·kg^{-1} · dag^{-1})

k_2 = första ordningens konstant för utsöndring från fisk (dag^{-1})

k_g = första ordningens konstant för fiskens tillväxt (”utspädning på grund av tillväxt”) (dag^{-1})

k_m = första ordningens konstant för metabolisk transformation (dag^{-1})

k_e = första ordningens konstant för fekal egestion (dag^{-1})

C_w = koncentration i vatten (mg·l^{-1})

C_f = koncentration i fisk (mg kg^{-1} våtvikt)

För bioackumulerande ämnen kan ett tidsviktat genomsnitt (TWA) förväntas vara den mest relevanta exponeringskoncentrationen i vatten (C_w) inom det tillåtna fluktueringsintervallet (jfr punkt 24). Ett tidsviktat genomsnitt för vattenkoncentrationen bör beräknas enligt förfarandet i tillägg 6 till testmetod C.20 (2). Observera att ln-transformationen av vattenkoncentrationen är lämplig när ett exponentiellt sönderfall mellan förnyelseperioderna förväntas, t.ex. i en semi-statisk testutformning. I ett genomflödessystem kanske ln-transformation av exponeringskoncentrationerna inte är nödvändig. Om TWA-vattenkoncentrationer härleds bör de redovisas och användas i beräkningarna.

I ett BCF-test av standardtyp kan upptagning och utsöndring beskrivas i form av första ordningens kinetiska processer.

▼M7

Upptagningstakt = $k_1 \times C_w$ [Ekvation A5.2]

Total förlusttakt = $(k_2 + k_g + k_m + k_e) \times C_f$ [Ekvation A5.3]

Vid stabilt tillstånd behöver man inte uppskatta tillväxt och metabolism (dvs. värdena för k_g och k_m kan inte särskiljas från noll). Upptagningskonstanten motsvarar utsöndringskonstanten. En kombination av ekvation A5.2 och ekvation A5.3 ger då följande förhållande:

$$BCF = \frac{C_{f\ -SS}}{C_{w\ -SS}} = \frac{k_1}{k_2} \quad \text{[Ekvation A5.4]}$$

där

$C_{f\text{-}SS}$ = Koncentration i fisken vid stabilt tillstånd, mg kg^{-1} våtvikt)

$C_{w\text{-}SS}$ = Koncentration i vatten vid stabilt tillstånd (mg l^{-1}).

Förhållandet k_1/k_2 kallas kinetisk BCF (BCF_K) och bör motsvara BCF i stabilt tillstånd (BCF_{SS}), som erhålls från förhållandet mellan den stabila koncentrationen i fisk och den stabila koncentrationen i vatten. Avvikelser kan dock förekomma om det stabila tillståndet var osäkert eller om tillväxtkorrigeringar har tillämpats på den kinetiska BCF. Eftersom k_1 och k_2 är konstanter behöver stabilt tillstånd inte nås för att härleda en BCF_K.

Tillägg 5 innehåller de allmänna beräkningar som behövs för bioackumuleringsmetoden med exponering via vatten och via föda. Beräkningarna grundas på dessa första ordningens ekvationer. Avsnitten 5, 6 och 8 är dock endast relevanta för vattenexponeringsmetoden, men båda metoderna finns med här eftersom de är ”allmänna” tekniker. De stegvisa metoderna (avsnitten 4 och 5) och de samtidiga metoderna (avsnitt 6) möjliggör beräkning av upptagnings- och utsöndringskonstanter som används för att härleda kinetisk BCF. Den stegvisa metoden för bestämning av k_2 (avsnitt 4) är viktig för metoden med exponering via föda, eftersom den behövs för att beräkna både assimileringseffektivitet och BMF. De beräkningar som är specifika för metoden med exponering via föda anges i tillägg 7.

2. PREDIKTION AV UPPTAGNINGSFASENS LÄNGD

Innan provet påbörjas ska en uppskattning av k_2 göras, och hänsyn till hur stor del av tiden som krävs för att nå stabilitet kan inhämtas från empiriska förhållanden mellan k_2 och fördelningskoefficienten n-oktanol/vatten (K_{OW}) eller k_1, och BCF. Man bör dock vara medveten om att ekvationerna i detta avsnitt endast gäller när upptagnings- och utsöndringsfaserna följer första ordningens kinetik. Om så uppenbart inte är fallet bör man dock inhämta råd från biostatistiker och/eller farmakokinetiker om förutsägelser av upptagningsfasen är önskvärda.

En uppskattning av k_2 (dag^{-1}) kan erhållas med flera metoder. Följande empiriska förhållanden kan t.ex. användas som ett första steg ([1]):

$\log k_2 = 1{,}47 - 0{,}414 \log K_{OW}$ ($r^2 = 0{,}95$) [(3), ekvation A5.5]

eller

$$k_2 = \frac{k_1}{BCF} \quad \text{[Ekvation A5.6]}$$

där $k_1 = 520 \times W^{-0{,}32}$ (för ämnen med en log $K_{OW} > 3$) ($r^2 = 0{,}85$) [(4), Ekvation A5.7]

([1]) Precis som för alla empiriska förhållanden bör man kontrollera att testämnet omfattas av förhållandets tillämpningsområde

▼M7

och $BCF = 10^{(0{,}910 \cdot logK_{OW} - 1{,}975 \cdot log(6{,}8 \cdot 10^{-7} K_{OW} + 1) - 0{,}786)}$ (r^2 = 0,90) [(5), Ekvation A5.8]

W = vikt för behandlad fisk (gram våtvikt) i slutet av upptagningsfasen/i början av utsöndringsfasen ([1]).

För andra relaterade förhållanden se (6). Det kan vara fördelaktigt att tillämpa mer komplicerade modeller för uppskattningen av k_2 om det t.ex. är sannolikt att betydlig metabolism kan förekomma (7) (8). Eftersom komplexiteten ökar bör man dock vara försiktigare med tolkningen av uppskattningarna. Förekomsten av nitrogrupper kan t.ex. tyda på snabb metabolism, men så är inte alltid fallet. Vid schemaläggningen av undersökningen bör man därför väga resultaten från den prediktiva metoden mot kemisk struktur och annan relevant information (t.ex. preliminära undersökningar).

Tiden för att nå en viss del av den stabila nivån kan fås genom tillämpning av så kallad k_2-bedömning, med den allmänna kinetiska ekvationen för upptagning och utsöndring (första ordningens kinetik), med antagandet att tillväxt och metabolism är försumbara: Om signifikant tillväxt förekommer under undersökningen kommer de uppskattningar som beskrivs nedan inte att vara tillförlitliga. I ett sådant fall är det bättre att använda den tillväxtkorrigerade k_{2g}, vilket beskrivs senare (se avsnitt 7 i detta tillägg):

$$\frac{dC_f}{dt} = k_1 C_W - k_2 C_f \qquad \text{[Ekvation A5.9]}$$

eller om C_w är konstant:

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_W (1 - e^{-k_2 t}) \qquad \text{[Ekvation A5.10]}$$

När stabiliteten börjar närma sig ($t \rightarrow \infty$), kan ekvation A5.10 reduceras (jfr (9) (10)) till:

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_W \qquad \text{[Ekvation A5.11]}$$

eller

$$\frac{C_f}{C_w} = \frac{k_1}{k_2} = BCF \qquad \text{[Ekvation A5.12]}$$

Då är BCF × C_w en approximation till koncentrationen i fisken vid stabilt tillstånd ($C_{f\text{-}SS}$). [Obs: samma metod kan användas för uppskattningar av en stabil BMF i testet med exponering via föda. I detta fall ersätts BCF med BMF och C_w med C_{food}, koncentration i fodret, i ovanstående ekvationer.]

Ekvation A5.10 kan skrivas om på följande sätt:

$$C_f = C_{f\ -SS}(1 - e^{-k_2 t}) \qquad \text{[Ekvation A5.13]}$$

eller

$$\frac{C_f}{C_{f\ -SS}} = 1 - e^{-k_2 t} \qquad \text{[Ekvation A5.14]}$$

Vid användning av ekvation A5.14 kan tiden för att nå viss stabilitet förutsägas när k_2 förutbestäms med ekvation A5.5 eller A5.6.

Som riktlinje kan sägas att den statistiskt optimala längden på upptagningsfasen, för produktion av statistiskt acceptabla data (BCF_k) är den period som krävs för att kurvan över koncentrationslogaritmen för det undersökta ämnet i

([1]) Fiskens vikt i slutet av upptagningsfasen kan uppskattas från tidigare undersökningsdata eller kunskap om artens sannolika viktökning, från en typisk vikt vid teststarten och under en upptagningsfas med typisk varaktighet (t.ex. 28 dagar).

▼M7

fisken, avsatt mot en linjär tidsaxel, till att nå minst 50-procentig stabilitet (dvs. 0,69/k_2), men inte mer än 95-procentig stabilitet (dvs. 3,0/k_2) (11). Om ackumuleringen går utöver 95 % stabilt tillstånd kan en beräkning av BCF_{SS} göras.

Tiden för att nå 80 % stabilt tillstånd är (med användning av ekvation A5.14):

$$0,80 = 1 - e^{-k_2 t} \qquad \text{[Ekvation A5.15]}$$

eller

$$t_{80} = \frac{-\ln(0,20)}{k_2} = \frac{1,6}{k_2} \qquad \text{[Ekvation A5.16]}$$

Likaså är tiden för att nå 95 % stabilt tillstånd:

$$t_{95} = \frac{-ln(0,05)}{k_2} = \frac{3,0}{k_2} \qquad \text{[Ekvation A5.17]}$$

Upptagningsfasens varaktighet (dvs. tiden till dess att en viss procent av stabilt tillstånd nås, t.ex. t_{80} eller t_{95}) för ett testämne med log K_{OW} = 4 skulle t.ex. vara (med användning av ekvationerna A5.5, A5.16 och A5.17):

$$logk_2 = 1,47 - 0,414 \cdot 4$$

$$k_2 = 0,652 \text{ dag}^{-1}$$

$$t_{80} = \frac{1,6}{0,652} = 2,45\text{dagar (59 timmar)}$$

eller $t_{95} = \frac{3,0}{0,652} = 4,60\text{dagar (110timmar.)}$

Alternativt kan följande uttryck användas:

$$t_{eSS} = 6,54 \cdot 10^{-3} \cdot K_{OW} + 55,31 \text{ (timmar)} \qquad \text{[Ekvation A5.18]}$$

kan användas för att beräkna den tid det tar tills faktiskt stabilt tillstånd (t_{eSS}) uppnås (12). För ett testämne med logg Kow = 4 resulterar detta i:

$$t_{eSS} = 6,54 \cdot 10^{-3} \cdot 10^4 + 55,31 = 121 \text{ timmar}$$

3. PREDIKTION AV UTSÖNDRINGSFASENS LÄNGD

Prediktion av den tid som krävs för att minska mängden ämne i kroppen, till en viss del av den ursprungliga koncentrationen, kan också göras med den allmänna ekvationen för upptagning och utsöndring (med första ordningens kinetik), jfr Ekvation A5.9 (1) (13).

För utsöndringsfasen antas C_w (eller C_{food} för testet med exponering via föda) vara noll. Ekvationen kan därefter reduceras till:

$$\frac{dC_f}{dt} = k_2 C_f \qquad \text{[Ekvation A5.19]}$$

eller

$$C_f = C_{f,0} \cdot e^{-k_2 t} \qquad \text{[Ekvation A5.20]}$$

där $C_{f,0}$ är koncentrationen vid början av utsöndringsperioden.

50-procentig utsöndring nås då vid tiden (t_{50}):

▼M7

$$\frac{C_f}{C_{f,0}} = \frac{1}{2} = e^{-k_2 t_{50}}$$

eller

$$t_{50} = \frac{-ln\,(0{,}50)}{k_2} = \frac{0{,}693}{k_2}$$

Likaså kommer 95-procentig utsöndring att nås vid:

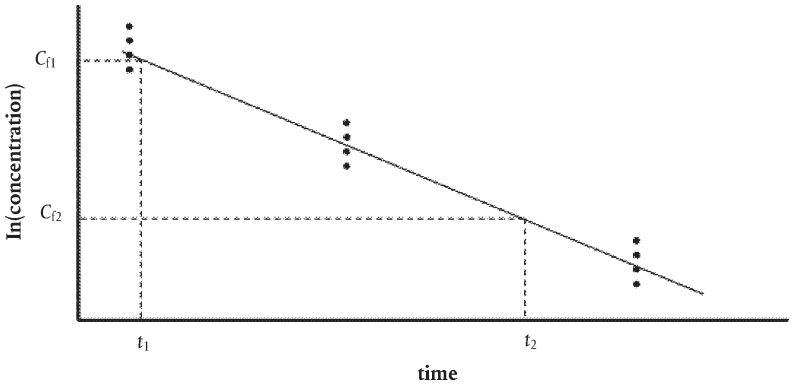
$$t_{95} = \frac{-ln\,(0{,}05)}{k_2} = \frac{3{,}0}{k_2}$$

Om en upptagning på 80 % används för den första perioden ($1{,}6/k_2$) och en 95-procentig förlust i utsöndringsfasen ($3{,}0/k_2$), är utsöndringsfasen ungefär dubbelt så lång som utsöndringen i upptagningsfasen.

Observera dock att dessa beräkningar är grundade på förutsättningen att upptagnings-och utsöndringsmönstren följer första ordningens kinetik. Om det är uppenbart att första ordningens kinetik inte följs är dessa uppskattningar inte giltiga.

4. STEGVIS METOD: BESTÄMNING AV UTSÖNDRINGSKONSTANTEN (FÖRLUST) K_2

De flesta biokoncentrationsdata har förutsatts bli skäligen väl beskrivna med en enkel tvådelad modell eller tvåparametersmodell, på det sätt som visas med den räta kurva som närmar sig punkterna för koncentrationen i fisk (på en ln-skala) under utsöndringsfasen.



Observera att avvikelser från en rät linje kan vara ett tecken på ett mer komplext utsöndringsmönster än första ordningens kinetik. Den grafiska metoden kan användas för att särskilja utsöndringstyper som avviker från första ordningens kinetik.

För att beräkna k_2 för flera provtagningstillfällen och provtagningspunkter görs en linjär regression av ln(koncentration) mot tiden. Regressionslinjens lutning är en uppskattning av utsöndringskonstanten k_2 ([1]). Utifrån skärningspunkten är det enkelt att beräkna den genomsnittliga koncentrationen i fisken i början av utsöndringsfasen($C_{0,d}$, som motsvarar den genomsnittliga koncentrationen i fisken i slutet av upptagningsfasen (inklusive felmarginaler) ([1]):

([1]) De flesta program som tillåter linjär regression ger även standardfel och konfidensintervall (CI) för uppskattningarna, t.ex. Microsoft Excel med verktygspaketet för dataanalys.

▼M7

$$C_{0,d} = e^{\text{intercept}} \qquad \text{[Ekvation A5.21]}$$

Vid beräkning av k_2 när endast två provtagningstidpunkter och provtagningspunkter finns tillgängliga (som i den minimerade utformningen) ersätts de två genomsnittliga koncentrationerna i följande ekvation:

$$k_2 = \frac{\ln(C_{f1}) - \ln(C_{f2})}{t_2 - t_1} \qquad \text{[Ekvation A5.22]}$$

Där $\ln(C_{f1})$ och $\ln(C_{f2})$ är de naturliga logaritmerna för koncentrationerna vid tidpunkterna t_1 respektive t_2, och t_2 och t_1 är de tidpunkter då de två proven samlades in i förhållande till utsöndringsfasens början ([1]).

5. STEGVIS METOD: BESTÄMNING AV UPPTAGNINGSKONSTANTEN K_1 (ENDAST VATTENEXPONERINGSMETODEN)

För att finna ett värde för k_1 utifrån en uppsättning koncentrationsdata sekventiella i tiden för upptagningsfasen behövs ett datorprogram som passar följande modell:

$$C_f(t) = C_w(t) \cdot \frac{k_1}{k_2} \cdot (1 - e^{-k_2 t}) \qquad \text{[Ekvation A5.23]}$$

Om k_2 fås fram genom den föregående beräkningen är $C_f(t)$ och $C_w(t)$ koncentrationerna i fisk respektive vatten vid tidpunkten t.

För att beräkna k_1 när endast två provtagningstidpunkter och provtagningspunkter finns tillgängliga (som i den minimerade utformningen) används följande formel:

$$k_1 = \frac{C_f \cdot k_2}{C_w(1 - e^{-k_2 t})} \qquad \text{[Ekvation A5.24]}$$

Om k_2 fås fram genom den föregående beräkningen är C_f koncentrationen i fisken i början av utsöndringsfasen, och C_w är den genomsnittliga koncentrationen i vattnet under upptagningsfasen ([2]).

En visuell inspektion av lutningarna för k_1 och k_2 när de avsätts mot uppmätta data vid provtagningspunkterna kan användas för att bedöma anpassningsgraden. Om det visar sig att den stegvisa metoden har gett en dålig uppskattning för k_1 bör den samtidiga metoden för att beräkna k_1 och k_2 användas (se avsnitt 6). Även här bör de resulterande lutningarna jämföras mot avsatta uppmätta data för visuell inspektion av anpassningsgraden. Om anpassningsgraden fortfarande är dålig kan det vara en indikation på att första ordningens kinetik inte gäller och mer komplexa metoder bör användas.

6. SAMTIDIG METOD FÖR BERÄKNING AV UPPTAGNINGSKONSTANTEN OCH UTSÖNDRINGSKONSTANTEN (FÖRLUST) (ENDAST VATTENEXPONERING)

Datorprogram kan användas för att finna värdena för k_1 och k_2 utifrån en uppsättning koncentrationsdata sekventiella i tiden och med följande ekvation:

$$C_f = C_w \cdot \frac{k_1}{k_2} \cdot (1 - e^{-k_2 t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{[Ekvation A5.25]}$$

$$C_f = C_w \cdot \frac{k_1}{k_2} \cdot (e^{-k_2(t - t_c)} - e^{-k_2 t}) \qquad t > t_c \qquad \text{[Ekvation A5.26]}$$

där

t_c = tidpunkten vid slutet av upptagningsfasen

Denna metod ger direkt standardfel för uppskattningarna av k_1 och k_2. När k_1/k_2 ersätts med BCV (jfr ekvation A5.4) i ekvationerna A5.25 och A5.26, kan även standardfelet och det 95-procentiga konfidensintervallet (CI) uppskattas. Detta är särskilt användbart vid jämförelser av uppskattningar som

([1]) Till skillnad från den linjära regressionsmetoden ger denna formel inte ett standardfel för k^2

([2]) Till skillnad från en linjär anpassningsmetod ger denna formel vanligen inte ett standardfel eller konfidensintervall för uppskattad k^1.

▼M7

skiljer sig åt på grund av datatransformation. Den beroende variabeln (fiskkoncentration) kan anpassas med eller utan ln-transformation, vilket gör det möjligt att beräkna osäkerheten för den resulterande BCF.

Eftersom ett starkt samband finns mellan de två parametrarna k_1 och k_2 om de beräknas samtidigt, kan det vara tillrådligt att först beräkna k_2 från enbart utsöndringsdata (se ovan). I de flesta fall kan k_2 uppskattas i utsöndringskurvan med förhållandevis hög precision och k_1 kan därefter beräknas från upptagningsdata med icke-linjär regression ([1]). Det rekommenderas att använda samma dataomvandling vid montering sekventiellt.

En visuell inspektion av de resulterande lutningarna när de avsätts mot uppmätta data vid provtagningspunkterna kan användas för att bedöma anpassningsgraden. Om det visar sig att denna metod har gett en dålig uppskattning för k_1 kan den samtidiga metoden för att beräkna k_1 och k_2 användas. Den anpassade modellen bör återigen jämföras mot avsatta uppmätta data för visuell inspektion av anpassningsgraden. De resulterande parameteruppskattningarna för k_1, k_2 och BCF och deras standardfel och/eller konfidensnivåer bör jämföras mellan olika typer av anpassningar.

Om anpassningsgraden är dålig kan det vara en indikation på att första ordningens kinetik inte gäller och mer komplexa metoder bör användas. En av de vanligaste komplikationerna är fiskens tillväxt under testet.

7. KORRIGERING AV UTSPÄDNING FÖR KINETISK BCF OCH BMF

I detta avsnitt beskrivs en standardmetod för korrigering på grund av fiskens tillväxt under testet (så kallad utspädning på grund av tillväxt). Metoden är endast giltig om första ordningens kinetik gäller. Om det finns indikationer på att första ordningens kinetik inte gäller bör man inhämta råd från biostatistiker för en korrekt korrigering av utspädning på grund av tillväxt eller använda den massbaserade metod som beskrivs nedan.

I vissa fall saknar denna metod för att korrigera utspädning på grund av tillväxt tillräcklig precision och ibland fungerar den inte (för mycket långsamt utsöndrande ämnen som testas hos snabbväxande fisk kan t.ex. den härledda utsöndringskonstanten korrigerad för utspädning på grund av tillväxt, k_{2g}, vara mycket liten, vilket innebär att det fel i de två konstanter som används för att härleda den blir kritiskt, och i andra fall kan k_g-uppskattningarna bli större än k_2). I sådana fall kan en alternativ metod (dvs. den massbaserade metoden) användas, som också fungerar om första ordningens kinetik inte har följts. På så sätt behöver man inte göra korrigeringar. Denna metod beskrivs i slutet av detta avsnitt.

Metod för att subtrahera tillväxtkonstanten för tillväxtkorrigering.

I standardmetoden omvandlas alla individuella vikt- och längddata till naturliga logaritmer, och ln(vikt) eller ln(1/vikt) avsätts mot tid (dag), separat för behandlings- och kontrollgrupperna. Samma process utförs separat för data från upptagnings- och utsöndringsfaserna. När det gäller korrigering av utspädning på grund av tillväxt är det i allmänhet lämpligare att använda

([1]) Man bör vara medveten om att osäkerheten i k2-uppskattningen inte används på rätt sätt i bioackumuleringsmodellen om den endast betraktas som en konstant när k1 passas in i den stegvisa modellen. Den osäkerhet i BCF som blir resultatet kommer därför att skilja sig mellan den samtidiga och den stegvisa modellen

▼M7

viktdata från hela undersökningen för att härleda tillväxtkonstanten (k_g), men statistiskt signifikanta skillnader mellan de tillväxtkonstanter som härletts för upptagnings- och utsöndringsfaserna kan visa att konstanten för utsöndringsfasen bör användas. Totala tillväxtkonstanter från vattenundersökningar för test- och kontrollgrupper kan användas för att kontrollera eventuella behandlingsrelaterade effekter.

En linjär korrelation med minsta kvadratmetoden beräknas för ln(fiskvikt) som funktion av dag (och för ln(1/vikt) som funktion av dag) för varje grupp (test- och kontrollgrupper, individuella data, inte dagliga medelvärden) för hela undersökningen och för upptagnings- och utsöndringsfaserna med användning av statistiska standardförfaranden. Varianserna i linjernas lutningar beräknas och används för att utvärdera den statistiska signifikansen ($p = 0,05$) för skillnaden i kurvorna (tillväxtkonstanter) med Student t-test (eller ANOVA om fler än en koncentration används). Viktdata är i allmänhet att föredra för tillväxtkorrigeringar. Längddata, behandlade på samma sätt, kan vara användbara för att jämföra test- och kontrollgrupperna med avseende på behandlingsrelaterade effekter. Om det inte finns någon statistiskt signifikant skillnad i analysen av viktdata kan test- och kontrolldata slås ihop och en total tillväxtkonstant för undersökningen (k_g) beräknas som den linjära korrelationens totala lutning. Om statistiskt signifikanta skillnader observeras ska tillväxthastighetskonstanterna för varje fiskgrupp och/eller undersökningsfas redovisas separat. Tillväxtkonstanten för varje behandlad grupp används sedan för korrigering av utspädning på grund av tillväxt för den gruppen. Om statistiska skillnader mellan upptagnings- och utsöndringsfasens konstanter observerats bör de konstanter som härletts från utsöndringsfasen användas.

Den beräknade tillväxtkonstanten (k_g, uttryckt som dag^{-1}) kan subtraheras från den totala utsöndringskonstanten (k_2) för att få fram utsöndringskonstanten, k_{2g}.

$$k_{2g} = k_2 - k_g \qquad \text{[Ekvation A5.27]}$$

Upptagningskonstanten divideras med den tillväxtkorrigerade utsöndringskonstanten för att få fram tillväxtkorrigerad kinetisk BCF, som benämns BCF_{Kg} (eller BMF_{Kg}).

$$BCF_{Kg} = \frac{k_1}{k_{2g}} \qquad \text{[Ekvation A5.28]}$$

En tillväxtkonstant som har härletts för ett test med exponering via föda används i ekvation A7.5 för att beräkna tillväxtkorrigerad BMF_{Kg} (jfr tillägg 7).

Massbaserad metod för tillväxtkorrigering

Det finns en alternativ metod till den ovanstående metoden för att subtrahera tillväxtkonstanten för tillväxtkorrigering, där man undviker behovet av korrigera för tillväxt. Metoden används enligt följande. Principen är att använda utsöndringsdata på massbasis per hel fisk i stället för en koncentrationsbaserad metod.

Konvertera vävnadskoncentrationer från utsöndringsfasen (testämnets massa/fiskens enhetsmassa) till testämnesmassa/fiskmassa: matcha koncentrationer och längd för enskilda fiskar i tabellform (t.ex. med användning av ett datakalkylblad) och multiplicera varje koncentration med total fiskvikt för den mätningen. På så sätt får man fram en uppsättning testämnesmassa/fiskmassa för alla prover från utsöndringsfasen.

Avsätt den resulterande naturliga logaritmen för data om ämnesmassa mot tidpunkten för försöket (utsöndringsfasen) så som skulle ha gjorts normalt.

▼M7

För vattenexponeringsmetoden härleds upptagningskonstanten rutinmässigt (se avsnitten 4 och 6), observera att ett ”normalt” k_2-värde bör användas i ekvationerna med anpassade kurvor för k_1) och härled utsöndringskonstanten från ovanstående data. Eftersom det resulterande värdet för utsöndringshastighetskonstanten är oberoende av tillväxt, eftersom det har härletts baserat på massa per hel fisk, bör det betecknas som k_{2g} och inte k_2.

8. NORMALISERING AV FETTHALTEN TILL 5 % (ENDAST VATTENEXPONERINGSMETODEN)

BCF-resultat (kinetiskt och stabilt tillstånd) från vattenexponeringstester bör också redovisas i förhållande till standardvärdet för fetthalt i fisk på 5 % (våtvikt) om det inte kan hävdas att testämnet inte primärt ackumuleras i fettet (t.ex. att vissa perfluorerade ämnen kan bindas till proteiner). Data om fiskkoncentration eller BCF måste omvandlas till 5 % fetthalt, våtvikt. Om samma fiskar har använts för att mäta ämneskoncentrationer och fetthalt vid alla provtagningspunkter måste varje enskild uppmätt koncentration i fisken korrigeras för det fettvärdet.

$$C_{f,L} = \frac{0,05}{L} \cdot C_f \qquad \text{[Ekvation A5.29]}$$

där

$C_{f,L}$ = koncentration i fisk normaliserad för fetthalt (mg kg^{-1} våtvikt)

L = fettfraktion (baserad på våtvikt)

C_f = koncentration av testämnet i fisken (mg kg^{-1} våtvikt)

Om fetthaltsanalysen inte har utförts på all provtagningsfisk används ett medelvärde för fetthalten för att normalisera BCF. För BCF i stabilt tillstånd bör man använda det medelvärde som registrerats för behandlingsgruppen i slutet av upptagningsfasen. När det gäller normalisering av en kinetisk BCF kan en annan metod krävas i vissa fall, t.ex. om fetthalten har förändrats markant under upptagnings- eller utsöndringsfasen. I alla händelser bör ett utfodringsintervall som minimerar dramatiska förändringar i fetthalten användas rutinmässigt.

$$BCF_{KL} = \frac{0.05}{L_n} \cdot BCF_K \qquad \text{[Ekvation A5.30]}$$

där

BCF_{KL} = kinetisk BCF normaliserad för fetthalt (L kg^{-1})

L_n = fettfraktion (baserat på våtvikt)

BCF_K = kinetisk BCF (L kg^{-1})

LITTERATUR

(1) Arnot J.A. och Gobas F.A.P.C. (2004), A food web bioaccumulation model for organic chemicals in aquatic ecosystems, Environ. Toxicol. Chem. 23: 2343–2355

(2) Kapitel C.20 i denna bilaga, Reproduktionstest på *Daphnia magna*.

(3) Spacie A. and Hamelink J.L. (1982), Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. Environ. Toxicol. Chem. 1: 309-320.

▼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

Tillägg 6

AVSNITT MED EKVATIONER FÖR VATTENEXPONERINGSTESTET: MINIMERAD TESTUTFORMNING

Den logiska grunden för denna metod är att biokoncentrationsfaktorn i ett fullständigt test antingen kan bestämmas som biokoncentrationsfaktorn i stabilt tillstånd (BCF_{SS}) genom att beräkna förhållandet mellan koncentrationen av testämnet i fiskens vävnader och testämnets koncentration i vatten, eller genom att beräkna den kinetiska biokoncentrationsfaktorn (BCF_K) som förhållandet mellan upptagningshastighetskonstanten k_1 och utsöndringskonstanten k_2. BCF_K är giltig även om ämnets koncentration inte uppnår stabilt tillstånd under upptagningsfasen, under förutsättning att upptagningen och utsöndringen sker ungefär enligt första ordningens kinetiska processer.

Om en mätning av ämneskoncentrationen i vävnader (C_{f1}) görs när exponeringsfasen avslutas (t_1) och koncentrationen i vävnaden (C_{f2}) mäts återigen efter en tid (t_2), kan utsöndringskonstanten (k_2) uppskattas med ekvation A5.22 i tillägg 5.

Upptagningskonstanten, k_1, kan sedan bestämmas algebraiskt med hjälp av ekvation A5.23 i tillägg 5 (där C_f motsvarar C_{f1} och t motsvarar t_1) (1). Den kinetiska biokoncentrationsfaktorn för den minimerade utformningen (som benämns BCF_{Km} för att åtskilja den från kinetiska biokoncentrationsfaktorer som bestämts med andra metoder) är således:

$$BCF_{Km} = \frac{k_1}{k_2} \qquad \text{[Ekvation A6.1]}$$

Koncentrationerna eller resultaten bör korrigeras för tillväxt på grund av utspädning och normaliseras till en fetthalt på 5 % enligt beskrivningen i tillägg 5.

Den minimerade BCF_{SS} är den BCF som beräknas i slutet av upptagningsfasen, med antagandet att stabilt tillstånd har uppnåtts. Detta kan bara antas, eftersom antalet provtagningspunkter inte är tillräckligt för att bevisa detta.

$$\text{minimeradBCF}_{SS} = \frac{C_{f\ -minSS}}{C_{w\ -minSS}} \qquad \text{[Ekvation A6.2]}$$

där

$C_{f\text{-}minSS}$ = koncentration i fisken vid antaget stabilt tillstånd i slutet av upptagningsfasen (mg kg^{-1} våtvikt),

$C_{w\text{-}minSS}$ = koncentration i vattnet vid antaget stabilt tillstånd i slutet av upptagningsfasen (mg l^{-1}).

LITTERATUR

(1) Springer T.A., Guiney P.D., Krueger H.O. och Jaber M.J. (2008), Assessment of an approach to estimating aquatic bioconcentration factors using reduced sampling. Environ. Toxicol. Chem. 27: 2271–2280.

▼M7

Tillägg 7

AVSNITT MED EKVATIONER FÖR TEST MED EXPONERING VIA FÖDA

1. Exempel på mängder för beståndsdelar i ett lämpligt kommersiellt fiskfoder

2. Exempel på inblandningstekniker

3. Beräkning av assimileringseffektiviteten och biomagnifikationsfaktorn

4. Korrigering för fetthalt

5. Utvärdering av skillnader mellan uppmätt koncentration vid tiden noll (C0, m) och härledd koncentration vid tiden noll (C0, d)

6. Vägledning för mycket snabbt utsöndrande testämnen

1. EXEMPEL PÅ MÄNGDER FÖR BESTÅNDSDELAR I ETT LÄMPLIGT KOMMERSIELLT FISKFODER

Huvudbeståndsdel	Fiskmjöl
Råprotein	≤ 55,0
Råfett	≤ 15,0 % ([1])
Växttråd	≥ 2,0
Fukt	≥ 12 %
Aska	≥ 8 %

([1]) I vissa regioner kan det endast vara möjligt att erhålla fiskfoder med en fettkoncentration som ligger långt från denna övre gräns. I ett sådant fall bör undersökningen utföras med lägre fettkoncentration i fodret som det levereras och utfodringsintervallerna justeras på lämpligt sätt för att upprätthålla fiskens hälsa. Foderfettet bör inte ökas artificiellt med ett överskott av olja.

2. EXEMPEL PÅ INBLANDNINGSTEKNIKER

Allmänt

Kontrollfodret bör beredas på exakt samma sätt som det behandlade fodret, men utan testämnet.

För ett kontrollera koncentrationen i det behandlade fodret bör tredubbla prover av det behandlade fodret extraheras med en lämplig extraktionsmetod för att mäta testämneskoncentration eller radioaktivitet. Höga analytiska utbyten (> 85 %) med låg variation mellan proverna bör påvisas (tre provkoncentrationer för ämnet tas vid teststarten, som inte får variera mer än ± 15 % från medelvärdet).

I testet med exponering via föda bör tre foderprover samlas in för analys dag 0 och i slutet av upptagningsfasen för att bestämma halten av testämne i fodret.

Beredning av fiskfoder med ett flytande testmaterial (rent)

En nominell måltestkoncentration i det behandlade fiskfodret fastställs, t.ex. 500 µg testämne/g foder. En lämplig mängd (per molmassa eller specifik radioaktivitet) av rent testämne tillsätts till en känd massa fiskfoder i ett glaskärl eller en rotationsindunstare. Massan av fiskfoder bör vara så stor att den räcker under hela upptagningsfasen (eftersom mängderna av varje

▼M7

foder måste ökas allteftersom fisken växer). Fiskfodret/testämnet bör blandas över natten med långsam tumling (t.ex. med en roto-rack-mixer eller en rotationsindunstare om en sådan används). Det behandlade fodret bör förvaras under förhållanden där testämnets stabilitet i foderblandningen upprätthålls (t.ex. kylning) fram till användning.

Beredning av fiskfoder med en majs- eller fiskoljevehikel

Fasta testämnen bör malas i en mortel till ett fint pulver. Flytande testämnen kan tillsättas direkt till majs eller fiskolja. Testämnet löses i en känd mängd majs eller fiskolja (t.ex. 5–15 ml). Den doserade oljan överförs kvantitativt till en rotationsindunstare av lämplig storlek. Den kolv som används för att bereda den doserade oljan sköljs med två små delar olja som sedan tillsätts rotationsindunstarens glasbehållare för att se till att allt upplöst testämne överförs. För att säkerställa fullständig upplösning/dispersion i oljan (eller om fler än ett testämne används i undersökningen) tillsätts en mikroomrörare, kolven proppas igen och blandningen ställs in på snabb omrörning över natten. En lämplig mängd fiskfoder (vanligen i pelletform) för testet tillsätts behållaren och glasbehållarens innehåll blandas homogent genom att behållaren kontinuerligt vänds i minst 30 minuter, men helst över natten. Därefter förvaras det behandlade fodret på lämpligt sätt (t.ex. i kylskåp) för att upprätthålla testämnets stabilitet i fodret fram till användning.

Beredning av fiskfoder med ett organiskt lösningsmedel

En lämplig mängd av testämnet (per molmassa eller specifik radioaktivitet), tillräcklig för att uppnå måldosen, löses upp i ett lämpligt organiskt lösningsmedel (t.ex. cyklohexan eller aceton, 10–40 ml, eller en större volym om det är nödvändigt beroende på kvaliteten på det foder som ska behandlas). Antingen en del eller alla delar (de tillsätts portionsvis) av denna lösning blandas med en tillräcklig massa fiskfoder för att uppnå testets fastställda nominella dosnivå. Fodret/testämnet kan blandas i en mixerskål av rostfritt stål. Det nydoserade fiskfodret lämnas kvar i skålen och får stå i ett dragskåp i två dagar (det ska röras om då och då) för att låta överskottet av lösningsmedel avdunsta. Det kan också blandas i en rotationsindunstare med kontinuerlig rotation. Överskottet av lösningsmedel kan ”blåsas” bort under en ström av luft eller kväve om så är nödvändigt. Det är viktigt att se till att testämnet inte kristalliseras när lösningsmedlet avlägsnas. Det behandlade fodret bör förvaras under förhållanden (t.ex. kylning) där testämnets stabilitet i foderblandningen upprätthålls fram till användning.

3. BERÄKNING AV ASSIMILERINGSEFFEKTIVITETEN OCH BIOMAGNIFIKATIONSFAKTORN

För att beräkna assimileringseffektiviteten bör man först uppskatta den totala avsöndringskonstanten enligt avsnitt 4 i tillägg 5 (med den ”stegvisa” metoden, dvs. den linjära standardmetoden) med användning av genomsnittliga provkoncentrationer från utsöndringsfasen. Utfodringskonstanten, I, och upptagningsfasens varaktighet, t, är kända parametrar i undersökningen. C_{food}, den genomsnittliga uppmätta koncentrationen av testämnet i fodret, är en uppmätt variabel i undersökningen. $C_{0,d}$, testämnets koncentration i fisken i slutet av upptagningsfasen, härleds i regel från skärningspunkten i ett diagram över ln(koncentration) som funktion av utsöndringsdag.

Ämnets assimileringseffektivitet (a, absorption av testämnet genom tarmen) beräknas enligt följande:

$$\alpha = \frac{C_{0,d} \cdot k_2}{I \cdot C_{food}} \cdot \frac{1}{1 - e^{-k_2 t}} \qquad \text{[Ekvation A7.1]}$$

där

$C_{0,d}$ = härledd koncentration i fisken vid nollkoncentration i tiden för utsöndringsfasen (mg kg^{-1}),

▼M7

k_2 = total (ej tillväxtkorrigerad) utsöndringskonstant (dag^{-1}), beräknad enligt ekvationerna i tillägg 5, avsnitt 3,

I = foderintagskonstant (g foder g^{-1} fisk dag^{-1}),

C_{food} = koncentration i fodret (mg kg^{-1} foder),

t = utfodringsperiodens varaktighet (dag)

Den utfodringskonstant, I, som används i beräkningen kan dock behöva justeras för tillväxt för att ge en korrekt assimileringseffektivitet, a. I ett test där fisken växer avsevärt under upptagningsfasen (och ingen korrigering av fodermängderna görs för att upprätthålla det fastställda utfodringsintervallet) kommer det effektiva utfodringsintervallet att vara lägre än det fastställda intervallet allteftersom upptagningsfasen fortsätter, vilket leder till en högre ”reell” assimileringseffektivitet. (Observera att detta inte är av vikt för den övergripande beräkningen av BMF, eftersom I-termerna upphävs mellan ekvation A7.1 och ekvation A7.4). Den genomsnittliga utfodringskonstanten korrigerad för utspädning på grund av tillväxt, I_g, kan härledas på flera sätt, men en direkt och noggrann metod är att använda den kända tillväxtkonstanten (k_g) för att uppskatta testfiskens vikt vid olika tidpunkter under upptagningsfasen, dvs.

$$W_f(t) = W_{f,0} \times e^{k_g \cdot t} \qquad \text{[Ekvation A7.2]}$$

där

$W_f(t)$ = genomsnittlig fiskvikt vid upptagningsfasens dag t

$W_{f,0}$ = fiskvikten vid försöksstarten

På detta sätt kan (åtminstone) fiskens genomsnittliga vikt på den sista exponeringsdagen ($W_{f,end\text{-}of\text{-}uptake}$) uppskattas. Eftersom utfodringskonstanten fastställdes baserat på $W_{f,0}$ kan den effektiva utfodringskonstanten för varje upptagningsdag beräknas med användning av dessa två viktvärden. Den tillväxtkorrigerade utfodringskonstanten, I_g (g foder g^{-1} fisk dag^{-1}), som används i stället för I vid snabb tillväxt under upptagningsfasen, kan då beräknas som

$$I_g = \frac{I \times W_{f,0}}{W_{f,end\text{-}of\text{-}uptake}} \qquad \text{[Ekvation A7.3]}$$

När assimileringseffektiviteten har erhållits kan BMF beräknas genom att den multipliceras med utfodringskonstanten I (eller I_g, om det värdet använts för att beräkna α). Därefter divideras produkten med den totala utsöndringskonstanten k_2:

$$BMF = \frac{I \times \alpha}{k_2} \qquad \text{[Ekvation A7.4]}$$

Den tillväxtkorrigerade biomagnifikationsfaktorn bör också beräknas på samma sätt, med användning av den tillväxtkorrigerade utsöndringskonstanten (som härleds enligt avsnitt 7 i tillägg 5). Återigen, om I_g har använts för att beräkna α, bör den även användas här i stället för I:

$$BMF = \frac{I \times \alpha}{k_{2g}} \qquad \text{[Ekvation A7.5]}$$

där

α = assimileringseffektivitet (absorption av testämnet genom tarmen),

k_2 = total (ej tillväxtkorrigerad) utsöndringskonstant (dag^{-1}), beräknad enligt ekvationerna i tillägg 5, avsnitt 3,

▼M7

k_{2g} = tillväxtkorrigerad utsöndringskonstant (dag^{-1}),

I = foderintagskonstant (g foder g^{-1} fisk dag^{-1}),

Den tillväxtkorrigerade halveringstiden ($t_{1/2}$) beräknas enligt följande:

$$t_{1/2} = \frac{0,693}{k_{2g}} \qquad \text{[Ekvation A7.6]}$$

Ämnets assimileringseffektivitet från födan kan också uppskattas om vävnadsrester bestäms under den linjära fasen av upptagningsfasen (mellan dag 1 och 3). I detta fall kan ämnets assimileringseffektivitet (α) bestämmas enligt följande:

$$\alpha = \frac{C_{fish}(t)}{I \times C_{food} \times t} \qquad \text{[Ekvation A7.7]}$$

där

$C_{fish}(t)$ = koncentration av testämnet i fisken vid tidpunkten t (mg kg^{-1} våtvikt).

4. KORRIGERING FÖR FETTHALT

Om fetthalten mättes i samma fisk som den kemiska analysen för alla provtagningsintervall bör de individuella koncentrationerna korrigeras för fetthalt och ln(koncentrationen, korrigerad för fetthalt) avsättas mot utsöndring (dag) för att få fram $C_{0,d}$ och k_2. Assimileringseffektiviteten (ekvation A7.1) kan därefter beräknas på grundval av fetthalt, med användning av C_{food} baserat på fetthalt (dvs. C_{food} multipliceras med fodrets genomsnittliga fettfraktion). Genom en beräkning med ekvationerna A7.4 och A7.5 får man därefter direkt fram BMF korrigerad för fetthalt (samt korrigerad för utspädning på grund av tillväxt).

I annat fall härleds den genomsnittliga fettfraktionen (massförhållande) i fisken och fodret både för behandlings- och kontrollgrupperna (för foder och fisken i kontrollgruppen görs detta vanligen från data som mäts i början och slutet av exponeringsperioden, för fisken i behandlingsgruppen görs det vanligen från data som mätts endast i slutet av exponeringsperioden). I vissa undersökningar kan fiskens fetthalt öka markant. I ett sådant fall är det lämpligare att använda en genomsnittlig fettkoncentration hos testfisken som beräknats från de uppmätta värdena i slutet av exponerings- och utsöndringsfaserna. Generellt bör endast data från behandlingsgruppen användas för att härleda båda fettfraktionerna.

Korrigeringsfaktorn för fetthalt (L_c) beräknas enligt följande:

$$L_C = \frac{L_{fish}}{L_{food}} \qquad \text{[Ekvation A7.8]}$$

där L_{fish} och L_{food} är de genomsnittliga fettfraktionerna i fisken respektive fodret.

Korrigeringsfaktorn för fetthalt används för att beräkna biomagnifikationsfaktorn korrigerad för fetthalt (BMF_L):

$$BMF_L = \frac{BMF}{L_C} \qquad \text{[Ekvation A7.9]}$$

5. UTVÄRDERING AV SKILLNADER MELLAN UPPMÄTT KONCENTRATION VID TIDEN NOLL ($C_{0,\ M}$) OCH HÄRLEDD KONCENTRATION VID TIDEN NOLL ($C_{0,\ D}$)

Den uppmätta koncentrationen vid tiden noll ($C_{0,\ m}$) och den härledda koncentrationen vid tiden noll ($C_{0,\ d}$) bör jämföras. Om de är mycket lika stöder detta den modell för första ordningen som använts för att härleda utsöndringsparametrarna.

▼M7

I vissa undersökningar kan det finnas en markerad skillnad mellan det härledda värdet vid tiden noll, $C_{0,d}$, och den genomsnittliga uppmätta koncentrationen vid tiden noll. $C_{0,\ m}$ (se sista punktsatsen i punkt 159 i denna testmetod). Om $C_{0,d}$ är mycket lägre än $C_{0,m}$ ($C_{0,d} << C_{0,m}$) kan skillnaden tyda på förekomst av osmält behandlat foder i tarmen. Detta kan testas experimentellt genom att en separat analys utförs på den utskurna tarmen i det fall ytterligare prover (hel fisk) togs och lagrades i slutet av upptagningsfasen. Om ett statistiskt giltigt test för avvikande värden tillämpat på utsöndringsfasens linjära regression visar att den första provtagningspunkten i utsöndringsfasen är felaktigt förhöjd, kan en linjär regression för att härleda k_2 vara lämplig, men utan den första utsöndringskoncentrationspunkten. Om osäkerheten i den linjära regressionen minskas starkt och det står klart att ungefärlig första ordningens kinetik för utsöndringen följdes, kan det vara lämpligt att använda de resulterande värdena $C_{0,d}$ och k_2 i beräkningen av assimileringseffektivitet. Detta bör vederbörligen motiveras i rapporten. Det är också möjligt att kinetik som inte är av första ordningen var verksam i utsöndringsfasen. Om detta är sannolikt (dvs. de data som omvandlats till naturliga logaritmer förefaller följa en kurva jämfört med den linjära regressionens ritade raka linje) är beräkningarna av k_2 och $C_{0,d}$ sannolikt ogiltiga och råd bör inhämtas från biostatistiker.

Om $C_{0,d}$ är mycket högre än det uppmätta värdet ($C_{0,d} >> C_{0,m}$) kan det tyda på följande: att ämnet utsöndrades mycket snabbt (dvs. provtagningspunkterna närmade sig den analytiska metodens kvantifieringsgräns i ett mycket tidigt skede i utsöndringsfasen, jfr avsnitt 6 nedan), att det finns en avvikelse från första ordningens kinetik, att den linjära regressionen för att härleda k_2 och $C_{0,d}$ är felaktig eller att det uppstod problem med de uppmätta koncentrationerna i undersökningen vid några provtagningstidpunkter. I sådana fall bör diagrammet över den linjära regressionen kontrolleras för att se om det finns bevis för prover som ligger vid eller nära kvantifieringsgränsen, om avvikelser förekommer och om det finns en uppenbar kurva (vilket tyder på att första ordningens kinetik inte följs). Detta ska redovisas i rapporten. Eventuella senare omvärderingar av den linjära regressionen för att förbättra de uppskattade värdena ska beskrivas och motiveras. Om en markerad avvikelse från första ordningens kinetik observeras är beräkningarna av k_2 och $C_{0,d}$ sannolikt ogiltiga och råd bör inhämtas från biostatistiker.

6. VÄGLEDNING FÖR MYCKET SNABBT UTSÖNDRANDE TESTÄMNEN

Såsom diskuteras i punkt 129 i testmetoden kan vissa ämnen utsöndras så snabbt att en tillförlitlig nollkoncentration i tid, $C_{0,d}$, och k_2 inte kan härledas. Detta beror på att det redan mycket tidigt i utsöndringsfasen (dvs. från det andra avsöndringsprovet och framåt) inte längre är möjligt att mäta proverna (koncentrationerna rapporteras vid kvantifieringsgränsen). Denna situation observerades för benso[a]pyren i den provningsjämförelse som utfördes som underlag för denna testmetod, och har dokumenterats i metodens valideringsrapport. I sådana fall är det inte möjligt att göra en tillförlitlig linjär regression. Den ger sannolikt en orealistiskt hög uppskattning av $C_{0,d}$, vilket leder till en skenbar assimileringseffekt som är mycket högre än 1. I dessa fall är det möjligt att beräkna en konservativ uppskattning av k_2 och en BMF med en övre gräns.

De datapunkter från utsöndringsfasen där en koncentration mättes, fram till och inklusive den första koncentration som inte detekteras (koncentration vid kvantifieringsgränsen), ger en linjär regression (med användning av koncentrationsdata som omvandlats med en naturlig logaritm mot tiden) en uppskattning av k_2. I dessa fall kommer sannolikt endast två datapunkter att vara aktuella (t.ex. provdagarna 1 och 2 i utsöndringsfasen). Därefter kan k_2 beräknas med hjälp av ekvation A5.22 i tillägg 5. Denna k_2-uppskattning kan användas för att uppskatta assimileringseffektiviteten enligt ekvation

▼**M7**

A7.1, genom att ersätta $C_{0,d}$-värdet i ekvationen med uppmätt nollkoncentration i tiden ($C_{0,m}$) i fall där det står klart att $C_{0,d}$ uppskattas vara mycket högre än det värde som skulle kunna uppnås i testet. Om $C_{0,\ m}$ inte var mätbart bör detektionsgränsen i fiskvävnad användas. Om detta i vissa fall ger ett värde på $\alpha > 1$ antas assimileringseffektiviteten vara 1 som ett ”värsta scenario”.

Därefter kan högsta BMF_K uppskattas med hjälp av ekvation A7.4, och bör anges som ”mycket mindre än” (<<) värdet. I en undersökning som har utförts med ett foderintervall på 3 %, en halveringstid för utsöndringen som är kortare än tre dagar och ett ”värsta scenario” α på 1, kommer BMF_K t.ex. sannolikt vara lägre än cirka 0,13. Med tanke på syftet med denna uppskattning och det faktum att värdena kommer att vara konservativa behöver de inte korrigeras för utspädning på grund av tillväxt eller fetthalt i fisk eller foder.

▼M7

Tillägg 8

METODER FÖR ATT UPPSKATTA PRELIMINÄRA BCF FRÅN DATA SOM SAMLATS IN I STUDIEN MED EXPONERING VIA FÖDA

Den metod med exponering via föda som ingår i denna testmetod för testning av bioackumulering av ämnen som i praktiken inte kan testas med metoden med exponering via vatten. Vattenexponeringsmetoden ger en biokoncentrationsfaktor, medan födoexponeringsmetoden leder direkt till information om utfodringens biomagnifikationspotential. Information om biokoncentration i vatten krävs enligt många kemikaliesäkerhetssystem (t.ex. för riskbedömningar och det globalt harmoniserade systemet för klassificering och märkning av kemikalier). Därför finns det ett behov av att använda data som genereras i födostudier för att uppskatta en biokoncentrationsfaktor som är jämförbar med tester som utförs enligt vattenexponeringsmetoden ([1]). I detta avsnitt behandlas metoder för att göra detta samt de inneboende bristerna i uppskattningarna.

Födostudien mäter utsöndring för att ge en utsöndringskonstant, k_2. Om en upptagningskonstant kan uppskattas på grundval av tillgängliga data i en situation där fisken har exponerats för testämnet via vatten kan också en kinetisk BCF uppskattas.

Uppskattningen av en upptagningskonstant för ett testämnes vattenexponering beror på många antaganden, som i sin tur gör uppskattningen osäker. I denna uppskattningsmetod för BCV antas också att den totala utsöndringen (inklusive bidragande faktorer som fördelning i kroppen och individuella utsöndringsprocesser) är oberoende i förhållande till den exponeringsmetod som används för att få fram en kroppsbelastning för testämnet.

Uppskattningsmetodens huvudsakliga antaganden kan sammanfattas enligt följande:

Utsöndringen efter upptagning via föda är densamma som utsöndringen efter exponering via vatten för ett givet ämne.

Upptagning från vatten följer första ordningens kinetik.

Beroende på vilken metod som används för att uppskatta upptagningen kan den korreleras

— endast med fiskvikt,

— endast med ämnets fördelningskoefficient oktanol/vatten,

— med en kombination av fiskvikt och ämnets fördelningskoefficient oktanol/vatten.

— Faktorer som kan påverka upptagningen i en vattenexponeringsundersökning i praktiken, såsom ämnets biotillgänglighet, adsorption till apparater, molekylärstorlek osv. har liten effekt.

— Det viktigaste är att

den databas (övningsuppsättning) som har använts för att ta fram metoden för uppskattning av upptagning är representativ för ämnet i fråga.

I flera publikationer i den allmänt tillgängliga litteraturen har man härlett ekvationer som kopplar upptagningen från vatten i fisk via gälarna till ämnets fördelningskoefficient oktanol/vatten, fiskvikt (1) (2) (3) (4), volym och/eller fetthalt, genomträngning/diffusion i membranet (5) (6), fiskens ventilationsvolym (7) och genom en metod för flyktighet/massbalans (8) (9) (10). En detaljerad bedömning av sådana metoder ges i Crookes och Brooke (11). En publikation av

([1]) För mycket hydrofoba ämnen är intag sannolikt den främsta exponeringsvägen i naturliga vattenmiljöer. En uppskattad BCF är därför inte helt representativ för ämnets bioackumulerande potential.

▼M7

Barber (12) som inriktas på modeller för bioackumulering genom upptagning via föda är också användbar i detta sammanhang eftersom den omfattar bidrag från modeller för upptagning via gälarna. En del av bakgrundsdokumentet till protokollet för exponering via föda från 2004 (13) ägnas också åt denna aspekt.

De flesta av dessa modeller verkar ha tagits fram med hjälp av begränsade databaser. För modeller där uppgifter från den databas som använts för att bygga upp modellen är tillgängliga verkar de typer av ämnen som används ofta ha en liknande struktur eller klass (funktionsmässigt, t.ex. klorerade kolväten). Detta gör det osäkert att använda en modell för att uppskatta upptagningskonstanten för en annan typ av ämne, förutom testspecifika överväganden som art, temperatur osv.

I en genomgång av tillgängliga tekniker (11) betonades att det inte finns en enda metod som är ”rätt”. Därför bör en tydlig motivering ges för den modell som används. Om det finns flera modeller tillgängliga som det är motiverat att använda kan det vara lämpligt att presentera flera uppskattningar av k_1 (och BCF) eller ett intervall av k_1-värden (och BCF) enligt flera uppskattningsmetoder för upptagning. Med tanke på skillnaderna mellan modelltyperna och de datauppsättningar som har använts för att ta fram modellerna är det inte lämpligt att ta fram ett medelvärde för uppskattningar som härletts på olika sätt.

Vissa forskare har hävdat att BCF-uppskattningar av denna typ kräver en korrigering för biotillgänglighet för att ta hänsyn till ämnets adsorption till löst organiskt kol (DOC) under vattenexponeringsbetingelser. Syftet är att anpassa uppskattningen till resultaten från vattenexponeringsundersökningar (t.ex. (13) (14)). Denna korrigering är dock inte alltid lämplig med tanke på de låga nivåer av DOC som krävs i en vattenexponeringsundersökning för en uppskattning enligt det ”värsta scenariot” (t.ex. förhållandet mellan ett biotillgängligt ämne och ett ämne uppmätt i lösning). För mycket hydrofoba ämnen kan upptagningen via gälarna begränsas på grund av nivån av passiv diffusion nära gälarnas yta. I detta fall kan korrigeringen ta hänsyn till denna effekt, och inte den effekt den utformades för.

I den födostudie som beskrivs här bör man fokusera på metoder som kräver indata för vilka det finns lätt tillgängliga uppgifter om de testade ämnena (dvs. log K_{OW}, fiskvikt). Andra metoder som kräver mer komplexa indata kan användas, men kan kräva ytterligare mätningar i testet eller detaljerad kunskap om testämnet eller fiskarterna som kanske inte finns allmänt tillgänglig. Dessutom kan valet av modell påverkas av valideringsnivån och tillämpningsområdet (en översikt över och jämförelse av de olika metoderna ges i (11)).

Man bör tänka på att den resulterande k_1-uppskattningen och uppskattad BCF är osäkra och kanske kräver en sammanvägd bedömning med härledd BMF och ämnesparametrar (t.ex. molekylstorlek) för en helhetsbild av ämnets bioackumuleringspotential. Tolkningen och användningen av dessa parametrar kan bero på regelverket.

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 TILLVÄXTTEST PÅ UNGA EXEMPLAR AV FISK

1. METOD

Denna metod för tillväxttest avseende toxicitet motsvarar OECD TG 215 (2000).

1.1 INLEDNING

Testet är avsett för bestämning av vilka verkningar långvarig exponering för kemikalier har på tillväxten hos unga exemplar av fisk. Testet baserar sig på en metod för bestämning av verkningarna av kemikalier på tillväxten hos unga exemplar av regnbågslax *(Oncorynchus mykiss)* under genomflödesförhållanden, en metod som har utvecklats och ringtestats (1) (2) inom Europeiska unionen. Även andra väldokumenterade arter kan användas. Man har t.ex. erfarenheter från tillväxttest med sebrafisk *(Danio rerio)* ([1]) (3) (4) och ricefish medaka *Oryzias* latipes) (5) (6) (7).

Se också den allmänna inledningen, del C.

1.2 DEFINITIONER

Lägsta koncentration vid vilken verkningar observeras (Lowest observed effect concentration, LOEC):

den lägsta testade koncentrationen av ett testämne vid vilken man kan observera signifikanta verkningar (vid $p < 0,05$) jämfört med kontrollgruppen. Alla testkoncentrationer ovanför LOEC måste framkalla skadliga verkningar som är lika stora eller större än de verkningar som kan observeras vid LOEC.

Koncentration vid vilken inga verkningar observeras (No observed effect concentration, NOEC): test-koncentrationen omedelbart under LOEC.

EC_x: den koncentration av testämnet som orsakar en tillväxtvariation på x % hos testexemplaren jämfört med kontrollgruppen.

Fisktäthet: våtvikten fisk per vattenvolym. **Antalstäthet:** antalet exemplar per vattenvolym.

Individuell specifik tillväxthastighet: tillväxthastigheten hos en individ, uppmätt med startvikten som utgångspunkt.

Kärlmedelvärdet för specifik tillväxthastighet: medeltillväxthastigheten hos en kärlpopulation vid en viss koncentration.

Pseudospecifik tillväxthastighet: den individuella tillväxthastigheten jämförd med kärlpopulationens medel-begynnelsevikt.

([1]) Meyer A.. Bierman C. H. och 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, 252, s. 231-236.

▼B

1.3 PRINICP FÖR TESTMETODEN

Unga fiskexemplar i exponentiell tillväxtfas vägs och placeras i testkärl där de exponeras för en serie subletala koncentrationer av testämnet upplöst i vatten. Exponeringen ska helst ske under genomflödesförhållanden eller, om detta inte är möjligt, under lämpliga halvstatiska förhållanden (statisk förnyelse). Testperiodens längd är 28 dagar. Fiskarna utfodras dagligen. Foderportionen baserar sig på fiskarnas begynnelsevikter och kan räknas om efter 14 dagar. Vid slutet av testet vägs fiskarna på nytt. Verkningarna på tillväxthastigheterna analyseras med en regressionsmodell för att bestämma den koncentration som leder till en variation på x % av tillväxthastigheten, dvs. EC_x (t.ex. EC_{10}, EC_{20} eller EC_{30}). Alternativt kan testdata jämföras med kontrollgruppens värden för att bestämma den lägsta koncentration vid vilken verkningar observeras (LOEC) och den koncentration vid vilken inga verkningar observeras (NOEC).

1.4 INFORMATION OM TESTÄMNET

Det bör finnas tillgäng till resultaten från ett test avseende akut toxicitet (se metod C1), som helst ska ha utförts med samma art som används för detta test. Testämnets vattenlöslighet och ångtryck måste vara kända. Det bör finnas tillgång till en tillförlitlig analysmetod for kvantifiering av ämnet i testlösningen och denna metod blir ha känd och rapporterad noggrannhet och detektionsgräns.

Till information som bör anges hör bl.a. testämnets strukturformel, ämnets renhet, stabilitet i vatten och ljus, pK_a, P_{ow} och resultaten från test avseende biologisk lättnedbrytbarhet (se metod C.4).

1.5 TESTETS GILTIGHET

För att testet ska vara giltigt måste följande villkor uppfyllas:

— Mortaliteten i kontrollgruppen (kontrollgrupperna) får inte överskrida 10 % vid testets slut.

— Medelvikten hos fiskarna i kontrollgruppen (kontrollgrupperna) måste ha ökat tillräckligt för att ge möjlighet att detektera den minsta variation som anses vara signifikant. Resultaten från ett ringtest (3) har visat att medelvikten för exemplar av regnbågslax i kontrollgrupperna under de 28 testdagarna måste ha ökat med minst hälften (50 %) av begynnelsevikten. Om t.ex. begynnelsevikten är 1 g per fisk (= 100 %) bör slutvikten efter 28 dagar vara ≥ 1,5 g per fisk (≥ 150 %).

— Koncentrationen upplöst syrgas måste under hela testet ha varit minst 60 % av luftmättnadsvärdet (ASV).

— Under testet får vattentemperaturen inte vid någon tidpunkt variera med mer än ± 1 °C mellan olika testkärl och den får variera med högst 2 °C från de temperaturgränser som specificerats för den art som används (se tillägg 1).

1.6 BESKRIVNING AV TESTMETODEN

1.6.1 **Utrustning**

Normal laboratorieutrustning och särskilt

a) syrgas- och pH-mätare,

▼B

b) utrustning för bestämning av hårdhet och alkalinitet hos vatten,

c) lämplig utrustning för temperaturreglering, helst med kontinuerlig övervakning,

d) kärl som är tillverkade av kemiskt inert material och tillräckligt stora med tanke på den rekommenderade fisktätheten och antalstätheten (se avsnitt 1.8.5 och tillägg 1),

e) lämplig precisionsvåg (t.ex. noggrannhet ±0,5 %).

1.6.2 **Vatten**

Som testvatten kan användas allt vatten i vilket den berörda arten uppvisar lämplig överlevnad och tillväxt under en längre period. Testvattnet bör ha konstant kvalitet under hela testperioden. Vattnets pH bör ligga inom intervallet 6,5–8,5 men får dock under ett givet test variera med högst ± 0,5 pH-enheter. Hårdhet över 140 mg/l (räknat som $CaCO_3$) rekommenderas. För att säkerställa att spädvattnet inte påverkar testresultaten på oönskat sätt (t.ex. genom komplexbildning med testämnet), bör vattenprover regelbundet tas för analys. Mätningar av tungmetaller (t.ex. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd och Ni), viktiga anjoner och katjoner (t.ex. Ca, Mg, Na, K, Cl och SO_4), bekämpningsmedel (t.ex. total mängd organiska fosforföreningar eller total mängd organiska klorföreningar), totalt organiskt kol och uppslammade partiklar bör göras t.ex. var tredje månad i fall där man vet att spädvattnet håller en relativt jämn kvalitet. Om vattenkvaliteten har visat sig vara jämn under minst ett år kan dessa kontroller göras med längre intervall (t.ex. var sjätte månad). I tillägg 2 anges ett antal kemiska egenskaper för godtagbart spädvatten.

1.6.3 **Testlösningar**

Testlösningar med de valda koncentrationerna bereds genom utspädning av en stamlösning.

Stamlösningen bör helst beredas genom enkel blandning eller omskakning av testämnet i spädvattnet på mekanisk väg (t.ex. omrörning och ultraljud). Mättnadskolonner (löslighetskolonner) kan användas för att få stamlösning av lämplig koncentration.

I vissa fall kan lösnings- eller dispergeringsmedel (lösningsagenter) behövas för att få en stamlösning av lämplig koncentration. Lämpliga lösningsmedel är t.ex. aceton, etanol, metanol, dimetylsulfoxid, dimetylformamid och trietylenglykol. Lämpliga dispergeringsmedel är t.ex. Cremophor RH40, Tween 80, metylcellulosa (0,01 %) och HCO-40. Om man använder agenter som är biologiskt lättnedbrytbara (t.ex. aceton) eller agenter med hög flyktighet bör man iaktta särskild försiktighet eftersom sådana agenter kan orsaka problem med bakterieansamling vid genomflödestest. Om en lösningsagent används får den inte ha signifikant verkan på fisktillväxten eller framkalla synliga skadliga verkningar på de unga exemplaren (verkningar som framkommit vid test med rent lösningsmedel).

▼B

För genomflödestest behövs ett system som kontinuerligt portionerar och späder ut stamlösning av testämnet så att man får en tillförsel av en serie koncentrationer till testkärlen. Stamlösningens och spädvattnets flödeshastighet bör kontrolleras regelbundet, helst dagligen, och får inte variera med mer än 10 % under hela testet. Resultaten från ett ringtest (3) har visat att en vattenavlägsning på 6 liter per gram fisk och dag är godtagbar vid test på regnbågslax (se avsnitt 1.8.2.2.).

För halvstatiskt test (statisk förnyelse) beror mediets förnyelsefrekvens på testämnets stabilitet, men daglig förnyelse rekommenderas. Om resultaten från preliminära stabilitetstest (se avsnitt 1.4) visar att testämnet inte är stabilt (dvs. utanför området 80 — 120 % av nominell koncentration eller under 80 % av uppmätt startkoncentration) under ett helt förnyelseintervall måste genomflödestest övervägas.

1.6.4 **Val av fiskart**

De flesta erfarenheterna från ringtest (1) (3) gäller regnbågslax *(Oncorhynchus mykiss)* och därför rekommenderas denna art för testet. Även andra väldokumenterade arter kan användas, men då måste testförfarandet eventuellt anpassas så att lämpliga testförhållanden erhålls. Det finns t.ex. erfarenheter från test med sebrafisk (Da-*nio rerio)* (4) (5) och ricefish (medaka, Oryzias *latipes)* (6) (7) (8). I ett sådant fall måste motiveringen för valet av art och testmetod rapporteras.

1.6.5 **Förvaring av fisk**

Testfiskarna ska tas från en population från en enda stam, helst från samma romläggning. Fiskarna bör, under minst två veckor före testets början, hållas i vatten med samma kvalitet och ljusförhållanden som det som används under testet. Fiskarna bör utfodras med en minimiportion på 2 % kroppsvikt per dag, helst 4 % kroppsvikt per dag, under hela förvaringsperioden och under testet.

Efter en inledande period på 48 timmar registreras mortaliteten och följande kriterier tillämpas:

— Om mortaliteten under sju dagar är högre än 10 % av populationen bör hela satsen förkastas.

— Om mortaliteten ligger mellan 5 och 10 % av populationen fortsätts acklimatiseringen under ytterligare sju dagar. Om mortaliteten under den andra sjudagarsperioden är högre än 5 % bör hela satsen förkastas.

— Om mortaliteten under sju dagar är lägre än 5 % av populationen kan satsen godtas.

Fiskarna bör inte ges behandling mot sjukdomar under de två veckorna före testet eller under testets gång.

▼B

1.7 TESTUTFORMNING

Begreppet ”testutformning” hänför sig till valet av antalet testkoncentrationer och deras inbördes nivåskillnad, antalet kärl vid varje koncentration och antalet fiskar per kärl. Vid testutformningen bör följande beaktas:

a) Undersökningens syfte.

b) Den statistiska analysmetod som kommer att användas.

c) Tillgången till försöksresurser och deras kostnader.

När det gäller undersökningens syfte bör man, om möjligt, specificera de statistiska krav som gäller för detekteringen av en given skillnad (t.ex. avseende tillväxthastighet) eller, alternativt, den noggrannhet med vilken EC_x (t.ex. x = 10, 20 eller 30 och helst inte under 10) måste bestämmas. Utan detta kan en hållbar definition av undersökningens storlek inte ges.

Det är viktigt att vara medveten om att en utformning som är optimal (bästa utnyttjande av resurser) för en viss metod för statistisk analys inte nödvändigtvis är optimal för en annan. Den utformning som rekommenderas för uppskattning av LOEC/NOEC är därför inte densamma som den utformning som rekommenderas för regressionsanalys.

1 de flesta fall är regressionsanalys att rekommendera framför variansanalys. Motiveringen till detta diskuteras av Stephan och Rogers (9). Om ingen lämplig regressionsmodell finns att tillgå ($r^2 < 0,9$) bör NOEC/LOEC användas.

1.7.1 **Utformning för regressionsanalys**

Följande faktorer är viktiga vid utformningen av ett test som ska analyseras med regression:

a) Den koncentration vid vilken verkningar observeras (t.ex. $EC_{10,20,30}$) och det koncentrationsområde som är av intresse med tanke på testämnets verkningar måste omfattas av de koncentrationer som används vid testet. Den noggrannhet med vilken man kan bestämma den koncentration vid vilken verkningar observeras är bäst när den berörda koncentrationen ligger i mitten av det testade koncentrationsområdet. Ett preliminärt orienterande försök kan vara till hjälp vid valet av lämpliga testkoncentrationer.

b) För att göra det möjligt att uppnå en tillfredsställande statistisk modell bör testet inbegripa minst ett kontrollkärl och fem extra kärl vid olika koncentrationer. När en lösningsagent används och när det är lämpligt bör ett kontrollkärl som innehåller lösningsagenten vid den högsta testade koncentrationen köras utöver testserien (se avsnitten 1.8.3 och 1.8.4).

c) En lämplig geometrisk eller logaritmisk serie (10) (se tillägg 3) kan användas. Fördelningen av testkoncentrationerna ska helst vara logaritmisk.

▼B

d) Om man har tillgång till fler än sex kärl bör de extra kärlen användas för replikat eller fördelas över koncentrationsområdet i syfte att minska skillnaderna mellan de olika koncentrationsnivåerna. Dessa båda alternativ är likvärdiga.

1.7.2 **Utformning för bestämning av NOEC/LOEC med variansanalys (ANOVA)**

Det ska helst finnas replikatkärl vid varje koncentration och den statistiska analysen bör göras på kärlnivå (10). Utan replikatkärl kan man inte beakta variabiliteten mellan kärl utöver den som beror på individuella skillnader mellan fiskar. Erfarenheterna har dock visat (11) att variabiliteten mellan kärl i de undersökta fallen har varit mycket liten jämförd med variabiliteten inom kärlet (dvs. mellan olika fiskar). Det är därför ett relativt godtagbart alternativ att göra den statistiska analysen pä nivån för individuella exemplar.

I regel används minst fem testkoncentrationer i en geometrisk serie med en faktor som helst inte bör överskrida 3,2.

När ett test utförs med replikatkärl bör antalet replikatkontrollkärl och därmed antalet fiskar i regel vara det dubbla jämfört med antalet vid testkoncentrationerna, och vid testkoncentrationerna bör antalet vara lika stort (13) (14) (15). Om däremot replikatkärl inte används bör antalet fiskar i kontrollgruppen vara lika stort som antalet vid varje testkoncentration.

Om man utgår från att ANOVA ska grunda sig på kärl i stället för individuella fiskar (det senare fallet skulle innebära antingen individuell märkning av fiskarna eller användning av pseudospecifika tillväxthastigheter [se avsnitt 2.1.2]), måste man ha ett tillräckligt antal replikatkärl för att möjliggöra bestämning av standardavvikelsen för koncentrationerna inom kärlen. Det betyder att frihetsgraderna för fel i variansanalysen bör vara minst 5 (10). Om endast kontrollgrupperna har replikat föreligger det fara för att felvariabiliteten ökar med ökande medelvärde för den berörda tillväxthastigheten. Eftersom tillväxthastigheten sannolikt minskar med ökande koncentration tenderar detta att leda till en överskattning av variabiliteten.

1.8 FÖRFARANDE

1.8.1 **Val och vägning av testfisk**

Det är viktigt att minimera fiskarnas viktvariationer vid testets början. 1 tillägg 1 anges lämpliga storleksområden för de olika arter som rekommenderas för detta test. De individuella vikterna för hela den fisksats som används för testet bor helst ligga inom ± 10 % av den aritmetiska medelvikten, och får under inga omständig- heter överskrida 25 %. Det rekommenderas att ett delprov av fiskar vägs före testet i syfte att uppskatta medelvikten.

▼B

Stampopulationen bör hållas utan foder under 24 timmar före testet. Därefter väljs fiskarna ut slumpmässigt. Fiskarna ges allmän bedövning (t.ex. med en vattenlösning av 100 mg/l trikainmetansulfonat (MS 222) neutraliserad genom tillsats av två delar natriumbikarbonat per del MS 222) och deras våtvikt (avtorkad fisk) bestäms individuellt med den noggrannhet som anges i tillägg 1. Fiskar med vikter inom det planerade området väljs ut och fördelas sedan slumpmässigt mellan testkärlen. Den totala vårvikten för fiskarna i vart och ett testkärl bör registreras. Bedövningen och hanteringen av fiskarna (inbegripet avtorkning och vägning) kan orsaka stress och skador pä de unga exemplaren, särskilt när det gäller små arter. Därför bör unga exemplar hanteras ytterst försiktigt så att stress och skador på testdjuren undviks.

Fiskarna vägs på nytt på testdag 28 (se avsnitt 1.8.6). Om det bedöms vara nödvändigt att räkna om foderportionen, kan fiskarna dock vägas på nytt på testdag 14 (se avsnitt 1.8.2.3). Det finns också andra metoder, t.ex. fotografiska metoder, för att bestämma om fiskarna har vuxit så mycket att portionerna behöver justeras.

1.8.2 **Exponeringsförhållanden**

1.8.2.1 *Varaktighet*

Testets varaktighet är ≥ 28 dagar.

1.8.2.2 *Fisktäthet och antalstäthet*

Det är viktigt att fisktätheten och antalstätheten är anpassade för de arter som testas (se tillägg 1). Om fisktätheten är för hög uppstår trängselstress som leder till minskade tillväxthastigheter och eventuellt också till sjukdomar. Om fisktätheten är for låg kan det uppstå ett territorialt beteende som också kan påverka tillväxten. Fisktätheten ska under alla omständigheter vara så låg att koncentrationen upplöst syrgas kan hållas på minst 60 % ASV utan luftning. Resultaten från ringtest (3) har visat att det för regnbågslax är lämpligt med en fisktäthet på 16 exemplar à 3 — 5 g i en 40-litersvolym. Rekommenderad vattenavlägsning under testet är 6 liter per fisk och dag.

1.8.2.3 *Utfodring*

Fiskarna ska ges lämpligt foder (tillägg 1) i tillräcklig mängd för att möjliggöra en godtagbar tillväxthastighet. Det är viktigt att se till att det inte uppstår mikrobtillväxt och vattenturbiditet. För regnbågslax kan man utgå från att villkoren uppfylls om fiskarna ges en portion på 4 % av kroppsvikten per dag (3) (16) (17) (18). Den dagliga portionen kan delas upp i två lika delar och ges vid två utfodringstillfällen per dag med minst 5 timmars mellanrum. Portionen baserar sig på fiskarnas totala begynnelsevikt i vart och ett av testkärlen. Om fiskarna vägs på nytt på dag 14 kan portionen därefter räknas om. Fiskarna ska inte ges foder under de 24 timmar som föregår vägningen.

▼B

Okonsumerat foder och fekalt material ska dagligen avlägsnas från testkärlen genom omsorgsfull rengöring av kärlets botten genom sugning.

1.8.2.4 *Ljus och temperatur*

Ljusperioden och vattentemperaturen bör vara anpassade för den art som testas (se tillägg 1).

1.8.3 **Testkoncentrationer**

I regel krävs fem koncentrationer av testämnet, oavsett vilken testutformning som används (se avsnitt 1.7.2). Tidigare kunskaper om testämnets toxicitet (t.ex. från test av akut toxicitet eller preliminära orienterande undersökningar) ar till hjälp vid valet av lämpliga testkoncentrationer. Om färre än fem testkoncentrationer används måste detta motiveras. Den högsta testkoncentrationen får inte överskrida testämnets löslighetsgräns i vatten.

Om en lösningsagent används för att underlätta beredningen av testlösningar får agentens slutkoncentration i testkärlet inte överskrida 0,1 ml/l och samma slutkoncentration bör helst användas i alla testkärl (se avsnitt 1.6.3). Man bör dock sträva efter att undvika användning av lösningsagenter.

1.8.4 **Kontrollsatser**

Antalet spädvattenskontrollsatser beror på testutformningen (se avsnitten 1.7–1.7.2). Om en lösningsagent används bör testet även omfatta lika stort antal kontrollsatser för lösningsagenten som för spädvattnet.

1.8.5 **Frekvensen för analytiska bestämningar och mätningar**

Under testets gång bör testämnets koncentrationer bestämmas med regelbundna intervall (se nedan).

Vid genomflödestest bör flödeshastigheterna för spädlösning och testämnets stamlösning kontrolleras regelbundet, helst dagligen. Under testets förlopp får flödeshastigheterna inte variera med mer än 10 %. Om det förväntas att testämneskoncentrationerna kommer att hållas inom ± 20 % av de nominella värdena (dvs. inom området 80–120 %, se avsnitten 1.6.2 och 1.6.3) är det tillrådligt att analysera de högsta och lägsta testkoncentrationerna åtminstone vid testets början och därefter varje vecka. Vid test där det inte förväntas att testämnes-koncentrationen kommer att hållas inom ± 20 % av de nominella värdena (med hänvisning till testämnets stabilitetsdata) är det nödvändigt att analysera alla testkoncentrationer, men enligt samma schema.

Vid halvstatiska test (förnyelsetest) där det förväntas att testämneskoncentrationen kommer att hållas inom ± 20 % av de nominella värdena är det tillrådligt att analysera de högsta och lägsta testkoncentrationerna åtminstone när de är nyberedda och strax före förnyelsen. Detta görs vid testets början och därefter varje vecka. Vid test där det inte förväntas att testämneskoncentrationen kommer att hållas inom dessa gränser måste alla testkoncentrationer analyseras enligt samma schema som används för stabilare ämnen.

▼B

Det rekommenderas att resultaten grundar sig på de uppmätta koncentrationerna. Om det däremot finns bevis för att testämnets koncentration i lösningen på ett tillfredsställande sätt har hållits inom ± 20 % av den nominella eller uppmätta startkoncentrationen under hela testperioden, kan resultaten grunda sig på nominella eller uppmätta värden.

Proverna kan behöva filtreras (t.ex. med porstorlek 0,45 μm) eller centrifugeras. Centrifugering rekommenderas. Om testmaterialet inte adsorberas på filter kan dock även filtrering godtas.

Under testets gång mäts upplöst syrgas, pH och temperatur i alla testkärl. Totalhårdhet och salthalt (om relevant) mäts i kontrollsatserna och i ett kärl med den högsta koncentrationen. Upplöst syrgas och salthalt (om relevant) mäts minst tre gånger (vid testets början, mitt och slut). Vid halvstatiskt test rekommenderas att upplöst syrgas mäts oftare, helst före och efter varje vattenförnyelse eller minst en gång i veckan. Vid halvstatiskt test mäts pH i början och i slutet av varje vattenförnyelse och vid genomflödestest minst varje vecka. Hårdheten och alkaliniteten mäts en gång per test. Temperaturen bör mätas dagligen och helst övervakas kontinuerligt i minst ett testkärl.

1.8.6 **Observationer**

Vikt: Vid testets slut vägs alla fiskar (våtvikt, dvs. avtorkade exemplar) antingen i grupper per testkärl eller individuellt. Vägning per testkärl är att föredra eftersom individuell vägning förutsätter att fiskarna har märkts individuellt. Om man gör individuella vägningar för bestämning av individuell specifik tillväxthastighet bör den märkningsteknik som väljs stressa djuren minimalt (ett lämpligt alternativ till frysmärkning är t.ex. användning av färgad tunn fisklina).

Under testperioden bör fiskarna inspekteras dagligen och alla yttre abnormaliteter (t.ex. blödningar eller avfärgning) och onormalt beteende bör registreras. Varje fall av fiskdöd bör registreras, och döda fiskar bör avlägsnas så snart som möjligt. Döda fiskar ska inte ersättas eftersom fisktätheten och antalstätheten är tillräcklig för att tillväxten inte ska påverkas av ändringar i antalet fiskar per kärl. Mängden foder som ges måste dock justeras.

2. DATA OCH RAPPORTERING

2.1 BEHANDLING AV RESULTATEN

Det rekommenderas att en statistiker deltar i både utformning och analys av testet, eftersom metoden medger betydande variationer i fråga om testutformning, t.ex. antalet testkärl, antalet testkoncentrationer, antalet fiskar osv. Med hänvisning till de många alternativen för testutformning ges inga specifika anvisningar om statistiska procedurer.

▼B

Tillväxthastigheterna bör inte beräknas för testkärl där mortaliteten överskrider 10 %. Mortaliteten bör dock anges för alla testkoncentrationer.

Oavsett vilken metod som väljs för analys av data består det centrala konceptet av den specifika tillväxthastigheten mellan tidpunkten t, och tidpunkten t,. Denna kan definieras på flera olika sätt, beroende på om fiskarna är individuellt märkta eller inte och om det krävs ett kärlmedelvärde.

$$r_1 = \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

$$r_2 = \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

$$r_3 = \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

där:

r_1 = individuell fiskspecifik tillväxthastighet

r_2 = specifik medeltillväxthastighet i kärlet

r_3 = pseudospecifik tillväxthastighet

w_1, w_2 = vikten hos en viss fisk vid tidpunkten t_1 respektive t_2

$\log_e w_1$ = logaritmen av vikten hos en individuell fisk vid testperiodens början

$\log_e w_2$ = logaritmen av vikten för en individuell fisk vid testperiodens slut

$\log_e W_1$ = medelvärdet för logaritmerna av värdena w_1 för fiskarna i kärlet vid testperiodens början

$\log_e W_2$ = medelvärdet för logaritmerna av värdena w_2 för fiskarna i kärlet vid testperiodens slut

t_1, t_2 = tidpunkten (dagar) vid testperiodens början och slut

r_1, r_2, r_3 kan beräknas för perioden dag 0–28 och i tillämpliga fall (t.ex. om mätning har gjorts dag 14) för perioderna dag 0–14 och dag 14–28.

2.1.1 **Analys av resultaten genom regression (koncentration-respons-modellering)**

Denna analysmetod innebär att en lämplig matematisk modell anpassas till förhållandet mellan den specifika tillväxthastigheten och koncentrationen. Genom modellen kan man uppskatta EC_X. dvs. önskat EC-värde. När denna metod används behöver r inte beräknas för individuella fiskar (r_1), utan analysen kan i stället basera sig på kärlets medelvärde for r (r_1). Den senare metoden är att föredra. Den är också lämpligare när man använder de minsta arterna.

Karlmedelvärdena för de specifika tillväxthastigheterna (r_2) plottas grafiskt mot koncentrationen, vilket ger möjlighet att granska förhållandet mellan koncentration och respons.

▼B

En lämplig modell bör väljas för att uttrycka förhållandet mellan r_2 och koncentrationen. Valet måste motiveras på tillbörligt sätt.

Om antalet fiskar som överlever inte är lika stort i varje kärl bör modellanpassningen, antingen den är enkel eller icke-linjär. viktas för att kompensera för de olika stora grupperna.

Den metod som används för anpassning av modellen måste ge möjlighet att uppskatta t.ex. EC_{20} och få fram spridningen kring värdet (standardfel eller konfidensintervall). Kurvan för den anpassade modellen bör visualiseras i förhållande till data så att det framgår i hur hög grad modellen stämmer (9) (19) (20) (21).

2.1.2 **Analys av resultaten för uppskattning av LOEC**

Om testet har omfattat replikering av kärl vid alla koncentrationsnivåer kan uppskattningen av LOEC basera sig på en variansanalys (ANOVA) av kärlmedelvärdet för specifik tillväxthastighet (se avsnitt 2.1) åtföljd av en lämplig metod (t.ex. Dunnetts eller Williams test (13) (14) (15 (22)) för jämförelse av medelvärdet r för varje koncentration med medelvärdet r för kontrollsatserna, i syfte att hitta den lägsta koncentration för vilken denna skillnad är signifikant vid en sannolikhetsnivå på 0,05. Om de antaganden som krävs för parametriska metoder inte uppfylls – onormal fördelning (t.ex. Shapiro-Wilks test) eller variansen är heterogen (Bartletts test) – bör man överväga att homogenisera varianserna genom transformering av data före ANOVA. Alternativt kan viktad ANOVA övervägas.

Om testet inte har omfattat replikering av kärl vid varje koncentration är kärlbaserad ANOVA okänslig eller omöjlig. I en sådan situation är det en godtagbar kompromiss att basera ANOVA på den pseudospecifika tillväxthastigheten r_3 för individuella fiskar.

Medelvärdet r_3 för varje testkoncentration kan sedan jämföras med medelvärdet r_3 för kontrollsatserna. LOEC kan därefter fås fram på ovan beskrivet sätt. Det bör konstateras att denna metod inte beaktar eller ger skydd mot variabiliteten mellan kärl, utöver den variabilitet som beaktas genom variabiliteten mellan individuella fiskar. Erfarenheter har dock visat (9) att variabiliteten mellan kärl är mycket liten jämfört med variabiliteten inom ett kärl (dvs. mellan fiskar). Om individuella fiskar inte inkluderas i analysen bör metoden för identifiering av utanförliggande värden anges tillsammans med en motivering.

2. TOLKNING AV RESULTATEN

Resultaten bör tolkas med försiktighet när de uppmätta koncentrationerna av det toxiska ämnet i testlösningen ligger på nivåer nära analysmetodens detektionsgräns eller – vid halvstatiska test – när koncentrationen av testämnet minskar mellan nyss beredd lösning och lösningen före förnyelsen.

2.3 TESTRAPPORT

Testrapporten ska innehålla nedan angivna uppgifter.

▼B

2.3.1 **Testämne:**

— Aggregationstillstånd och relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper.

— Kemiska identifieringsdata, inklusive renhet och i tillämpliga fall analysmetod för identifiering av testäm net.

2.3.2 **Testdjur:**

— Vetenskapligt namn.

— Tillgängliga uppgifter om stam, storlek, leverantör, eventuella förbehandlingar osv.

2.3.3 **Testförhållanden:**

— Testförfarande som har använts (t.ex. halvstatiskt test eller genomflödestest, fisktäthet, antalstäthet, osv.).

— Testutformning (t.ex. antalet testkarl, testkoncentrationer och replikat, antalet fiskar per karl).

— Metoden för beredning av stamlösningar och förnyelsefrekvensen (i förekommande fall bör även lösningsagenten och dess koncentration anges).

— Nominella testkoncentrationer, de uppmätta värdenas medelvärden och standardavvikelser i testkärlen och den metod med vilken dessa erhölls samt bevis för att mätningarna hänför sig till testämnets koncentratio ner i lösningen.

— Spädvattnets egenskaper: pH, hårdhet, alkalinitet, temperatur, koncentrationen upplöst syrgas, restklornivåer (om de har uppmätts), totalt organiskt kol, partikelinnehåll, testmediets salthalt (om den har uppmätts) och resultatet av alla övriga mätningar.

— Vattenkvaliteten i testkärlen: pH, hårdhet, temperatur och halten upplöst syrgas.

— Detaljerade uppgifter om utfodringen (t.ex. typ av foder, källa, hur mycket fiskarna har fått och hur ofta).

2.3.4 **Resultat:**

— Bevis för att kontrollgrupperna uppfyller validitetskriterierna för överlevnad. Data om varje förekomst av fiskdöd.

— Statistiska analystekniker som har använts, statistik baserad på replikat eller fisk, behandlingen av data och motivering för de tekniker som har använts.

— Data i tabellform över individuella fiskvikter och medeltal dag 0, dag 14 (om uppmätt) och dag 28, kärl medelvärde eller pseudospecifika tillväxthastigheter (enligt det som är lämpligt) för periodernadag 0–28, eller eventuellt dag 0–14 och dag 14–28.

— Resultat av den statistiska analysen (regressionsanalys eller ANOVA), helst i tabellform och grafisk form samt LOEC (p=0,05) och NOEC eller EC_X, om möjligt med standardfel (enligt det som är lämpligt).

▼B

— Förekomsten av eventuella ovanliga reaktioner hos fiskarna och eventuella synliga verkningar som har orsakats av testämnet.

3. HÄNVISNINGAR

1. Solbe J. K 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.). (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. Grossland N. O. (1985), A method to evaluate effects of toxic chemicals on fish growth. Chemosphere, 14, s. 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-dichloroanilinc on the early life stages of the Zebrafish *(Brachydanio rerio):* results of a comparative laboratory study. Ecotox. Environ. Safety, 21, s. 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./V.. 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, s. 287–297.

7. Benoit, D. A., Holcombe, G. \V. 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. US Environmental Protection Agency, Duluth, Minnesota.

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, s. 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 l/RM/28, 81 pp.

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 of fish. 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,]. Amer. Statist. Assoc, 50, s. 1096–1121.

13. Dunnett C. W. (1964), New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20, s. 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, s. 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, s. 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, s. 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 pp.

18. Bruce, R. D. and Versteeg D. J. (1992), A statistical procedure for modelling continuous toxicity data . Environ. Toxicol. Chem. 11, s. 1485–1494.

19. DeGraeve, G. M., Cooncy, |. M., Pollock, T. L, Reichenbach, J. H., Dean, Marcus, M. D. and Mclntyre, 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, No 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, Minnesota. 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, s. 510–531.

▼B

Tillägg 1

LÄMPLIGA TESTBETINGELSER OCH FISKARTER SOM REKOMMENDERAS FÖR TESTNING

Art	Rekommenderat temperaturområde (°C)	ljusperiod (timmar)	Rekommenderat intervall för fiskarnas begynnelsevikt (fe)	Mätningsnoggrannhet	Fisktäthet (g/l)	Antalstäthet (antal per liter)	Foder	Testets varaktighet (dagar)
Rekommenderad art								
Oncorhynchus mykiss Regnbågslax	12,5–16,0	12–16	1–5	Närmaste 100 mg	1,2–2,0	4	Torrfoder som är särskilt ägnat för laxyngel	≥ 28
Andra väldokumenterade arter								
Danio rerio Sebrafisk	21–25	12–16	0,050–0,100	Närmaste 1 mg	0,2–1,0	5–10	Levande föda (B*rachionus Artemia)*	> 28
Oryzias latipes ”Ricefish” (Medaka)	21–25	12–16	0,050–0,100	Närmaste 1 mg	0,2–1,0	5–20	Levande föda *(Brachionus Artemia)*	> 28

▼B

Tillägg 2

NÅGRA KEMISKA EGENSKAPER FÖR GODTAGBART SPÄDVATTEN

Ämne	Koncentrationer
Partikelinnehåll	< 20 mg/l
Totalt organiskt kol	< 2 mg/l
Ojoniserad ammoniak	< 1 µg/l
Restklor	< 10 µg/l
Total mängd bekämpningsmedel typ organiska fosforföreningar	< 50 ng/1
Total mängd bekämpningsmedel typ organiska klorföreningar samt polyklorerade bifeny-er	< 50 ng/1
Total mängd organiskt bundet klor	< 25 ng/1

▼B

Tillägg 3

i logaritmisk serie av koncentrationer lämpliga för toxicitetstest (9)

Kolumn (antalet koncentrationer mellan 100 och 10 eller mellan 10 och 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 serie av fem (eller flera) på varandra följande koncentrationer kan väljas ur en kolumn, Mittpunkterna mellan koncentrationerna i kolumn (x) finns i kolumn (2x + 1). De listade värdena kan representera koncentrationer uttryckta som procenthalt per volym eller vikt (mg/l eller µg/l). Värdena kan om nödvändigt multipliceras eller divideras med en eller flera tiopotenser. Kolumn 1 kan användas om det råder betydande osäkerhet om toxicitetsnivån.

▼B

C.15 FISK, KORTTIDSTEST AVSEENDE TOXICITET PA *EMBRYO-* OCH SÄCKYNGELSTADIERNA

1. Metod

Denna metod för korttidstest avseende toxicitet motsvarar OECD TG 212 (1998).

1.1 INLEDNING

Vid detta korttidstest avseende toxicitet på fiskembryon och säckyngel exponeras levnadsstadierna från nyligen befruktade ägg till slutet av säckyngelstadiet. Inget foder ges vid detta test, och testet avslutas medan säckynglen fortfarande får sin näring från gulesäcken.

Testet är avsett för bestämning av de letala och, i begränsad utsträckning, subletala verkningarna av kemikalier på de specifika stadier och specifika arter som testas. Testet kan ge användbar information i flera avseenden: dels bildar det en brygga mellan test avseende letala verkningar och test avseende subletala verkningar, dels kan det användas som ett screeningtest inför ett komplett test av de tidiga levnadsstadierna eller för test avseende kronisk toxicitet. Dessutom kan det användas för test av arter för vilka uppfödningsteknikerna inte är tillräckligt utvecklade för att täcka perioden för övergång från endogen till exogen utfodring.

Man bör beakta att endast tester som täcker alla stadier av fiskens livscykel i regel kan ge en tillförlitlig uppskattning om en kemikalies kroniska toxicitet för fisk, och att minskad exponering av levnadsfaser kan medföra lägre känslighet och underskattning av den kroniska toxiciteten. Man kan därför anta att ett test på embryon och säckyngel är mindre känsligt än ett komplett test av de tidiga levnadsstadierna, särskilt när det gäller kemikalier som är starkt lipofila (log P_{ow} > 4) och kemikalier med ett specifikt toxiskt verkningssätt. Man kan dock förvänta sig mindre skillnader i känslighet mellan de två testerna när det gäller kemikalier som har ett icke-specifikt, narkotiskt verkningssätt (1).

Fram till offentliggörandet av detta test har de flesta erfarenheterna från test på embryon och säckyngel erhållits med sötvattenfisken *Danio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae – sebrafisk). Närmare anvisningar om testförfarandet för denna art finns i tillägg 1. Det finns dock inga hinder för att använda andra arter för vilka det finns erfarenheter att tillgå (tabell 1).

1.2 DEFINITIONER

Lägsta koncentration vid vilken verkningar observeras (Lowest observed effect concentration, LOEC): den lägsta testade koncentrationen av ett testämne vid vilken man kan observera signifikanta verkningar (vid $p < 0,05$) jämfört med kontrollgruppen. Alla testkoncentrationer ovanför LOEC måste framkalla skadliga verkningar som är lika stora eller större än de verkningar som kan observeras vid LOEC.

Koncentration vid vilken inga verkningar observeras (No observed effect concentration, NOEC): testkoncentrationen omedelbart under LOEC.

▼B

1.3 PRINCIP FÖR TESTMETODEN

Fiskens embryo- och säckyngelstadier exponeras för en serie koncentrationer av testämnet upplöst i vatten. Testprotokollet innehåller en möjlighet att välja mellan halvstatiskt test och genomflödestest. Det valda alternativet beror på testämnets egenskaper. Testet inleds med att befruktade ägg placeras i testkärl. Testet avslutas strax innan någon av gulesäckarna i något av testkärlen har absorberats helt eller innan ynglen i kontrollgrupperna börjar dö på grund av svält. De letala och subletala verkningarna bedöms och jämförs med kontrollgruppernas värden i syfte att bestämma den lägsta koncentrationen vid vilken verkningar observeras och den koncentration vid vilken inga verkningar observeras. Alternativt kan verkningarna analyseras med hjälp av en regressionsmodell i syfte att uppskatta den koncentration som framkallar en given procentuell verkan (t.ex. LC/EC_x, där x är en definierad procentuell verkan).

1.4 INFORMATION OM TESTÄMNET

Man bör ha tillgång till resultaten från ett test avseende akut toxicitet (se metod C.1), som helst ska ha utförts med samma art som används för detta test. Sådana resultat kan vara till hjälp vid valet av lämpliga testkoncentrationer för testet på tidiga levnadsstadier. Testämnets vattenlöslighet (inbegripet lösligheten i testvattnet) och ångtryck måste vara kända. Man bör ha tillgång till en tillförlitlig analysmetod för kvantifiering av ämnet i testlösningen. Metoden bör ha känd och rapporterad noggrannhet och detektionsgräns.

För definition av testförhållandena bör man ange bl.a. testämnets strukturformel, ämnets renhet, stabilitet i ljus, stabilitet i testförhållandena. pKa, P_{ow} och resultaten från test avseende biologisk lättnedbrytbarhet (se metod C. 4).

1.5 TESTETS GILTIGHET

För att testet ska vara giltigt måste följande villkor uppfyllas:

— Den totala överlevnaden hos de befruktade äggen i kontrollgrupperna, och i tillämpliga fall i kärlen med rent lösningsmedel, måste vara högre eller lika med de gränsnivåer som definieras i tilläggen 2 och 3.

— Koncentrationen löst syrgas måste under hela testet ligga mellan 60 och 100 % av luftmättnadsvärdet (ASV).

— Under testet får vattentemperaturen inte variera med mer än ±1,5 °C mellan olika testkärl eller mellan påföljande dagar. Vattentemperaturen bör hållas inom de temperaturgränser som specificerats för den art som används (se bilagorna 2 och 3).

▼B

1.6 BESKRIVNING AV TESTMETODEN

1.6.1 **Testkärl**

Kärl av glas eller annat kemiskt inert material kan användas. Kärlen måste vara tillräckligt stora med tanke på lämplig fisktäthet (se avsnitt 1.7.1.2). Det rekommenderas att kärlen placeras slumpvis i testutrymmet. En randomiserad blockutformning med en behandling per block är att föredra framför en fullständigt randomiserad utformning, i de fall där det i laboratoriet förekommer sådana systematiska effekter som kan kontrolleras med hjälp av blockuppdelning. Eventuell blockuppdelning måste beaktas i de efterföljande dataanalyserna. Testkärlen bör avskärmas från oönskade störningar.

1.6.2 **Val av fiskart**

I tabell 1A anges rekommenderade fiskarter. Det hindrar inte att andra arter används (se exemplen i tabell 1B), men då måste testförfarandet eventuellt justeras så att lämpliga testförhållanden kan säkerställas. I ett sådant fall måste testrapporten innehålla en motivering för valet av art och testmetod.

1.6.3 **Förvaring av fiskyngel**

Närmare uppgifter om lämplig förvaring av fiskyngelstammen finns i OECD TG 210 ([1]) och i hänvisningarna (2), (3), (4), (5), (6).

1.6.4 **Hantering av embryon och yngel**

Embryon och yngel kan exponeras i mindre kärl, placerade i huvudkärlet, med sidor eller ändar av nät som möjliggör ett flöde av testlösning genom kärlet. För att få ett icke-turbulent flöde genom dessa små kärl kan de hållas hängande från en arm som sänker och höjer kärlen (de får dock inte höjas över ytan). Ett sifonspolat system kan också användas. Befruktade ägg av laxfiskar kan hållas på ställningar eller galler med så stora öppningar att ynglen kan falla igenom efter kläckningen. Om halvstatiskt testförfarande med fullständig daglig förnyelse används rekommenderas pasteur-pipetter för avlägsnandet av embryon och yngel (se avsnitt 1.6.6).

Om äggbehållare, galler eller nät har använts för att hålla äggen inom huvudkärlet tas dessa tillbehör bort efter att ynglen har kläckts ([1]), med undantag av nät som behövs för att hålla fiskarna på plats. Om yngel måste flyttas får de inte utsättas för luft, och nät får inte användas för att släppa ut fisk från äggbehållare (dessa säkerhetsåtgärder ar eventuellt inte nödvändiga om arten inte är så känslig, t.ex. när man använder karp). Överföringstidpunkten varierar beroende på art och det är inte alltid nödvändigt med en överföring. Vid halvstatiskt test kan man använda bägare eller grunda behållare, vid behov försedda med ett nät som finns en bit ovanför bägarens botten. Om bägarnas volym är tillräcklig med tanke på fisktätheten (se 1.7.1.2) är det eventuellt inte nödvändigt att överföra embryon eller yngel.

([1]) OECD. Paris. 1992,. Test Guideline 210. ”Fish. Early-life Stage Toxicity Test”.

▼B

1.6.5 **Vatten**

Som testvatten kan användas allt vatten som uppfyller de kemiska kraven för godtagbart spädvatten enligt tillägg 4 och i vilket testarternas kontrollgrupper har minst den överlevnadsgrad som anges i tilläggen 2 och 3. Testvattnet bör ha konstant kvalitet under hela testperioden. Vattnets pH-värde får variera med högst ±0,5 pH-enheter. För att säkerställa att spädvattnet inte påverkar testresultaten på oönskat sätt (t.ex. genom komplexbildning med testämnet) eller har skadliga verkningar på yngelstammens prestanda, tas vattenprover regelbundet för analys. Mätningar av tungmetaller (t.ex. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd och Ni), viktiga anjoner och katjoner (t.ex. Ca, Mg, Na, K, Cl och SO4), bekämpningsmedel (t.ex. total mängd organiska fosforföreningar eller total mängd organiska klorföreningar), totalt organiskt kol och uppslammade partiklar bör göras t.ex. var tredje månad i fall där man vet att spädvattnet håller en relativt jämn kvalitet. Om vattenkvaliteten har visat sig vara jämn under minst ett år kan dessa kontroller göras med längre intervall (t.ex. var sjätte månad).

1.6.6 **Testlösningar**

Testlösningar med de valda koncentrationerna bereds genom utspädning av en stamlösning.

Stamlösningen bör helst beredas genom enkel blandning eller omskakning av testämnet i spädvattnet på mekanisk väg (t.ex. omrörning och ultraljud). Mättnadskolonner (löslighetskolonner) kan användas för att få stamlösning av lämplig koncentration. Man bör så långt som möjligt undvika att använda lösnings- eller dispergeringsmedel (lösningsagenter). Sådana medel kan dock i vissa fall behövas för att få en stamlösning av lämplig koncentration. Lämpliga lösningsmedel är t.ex. aceton, etanol, metanol, dimetylformamid och trietylenglykol. Lämpliga dispergeringsmedel är t.ex. Cremophor RH40, Tween 80, metylcellulosa (0,01 %) och HCO-40. Om man använder agenter som är biologiskt lättnedbrytbara (t.ex. aceton) eller agenter med hög flyktighet bör man iaktta särskild försiktighet eftersom sådana agenter kan orsaka problem med bakterieansamling vid genomflödestest. Om en lösningsagent används får den inte ha signifikant verkan på överlevnaden eller framkalla synliga skadliga verkningar på tidiga levnadsstadier (verkningar som framkommit vid test med rent lösningsmedel). Användningen av sådana ämnen bör undvikas med alla medel.

Vid halvstatiskt test kan man välja mellan två olika förnyelseförfaranden. Det ena innebär att nya testlösningar bereds i rena kärl och överlevande ägg och yngel överförs försiktigt till de nya kärlen i en liten volym gammal lösning, samtidigt som man undviker exponering för luft. Det andra förfarandet innebär att organismerna hålls kvar i kärlen medan en andel (minst tre fjärdedelar) av testvattnet byts ut. Hur ofta mediet måste förnyas beror på testämnets stabilitet, men daglig förnyelse rekommenderas. Om resultaten från preliminära stabilitetstest (se avsnitt 1.4) visar att testämnet inte är stabilt (dvs. utanför området 80–120 % av nominell koncentration eller under 80 % av uppmätt startkoncentration) under ett helt förnyelseintervall, måste genomflödestest övervägas. Under alla omständigheter bör man undvika att stressa ynglen när man förnyar vattnet.

▼B

För genomflödestest behövs ett system som kontinuerligt portionerar och späder ut stamlösning av testämnet, så att man får en tillförsel av en serie koncentrationer till testkärlen. Stamlösningens och spädvattnets flödeshastighet bör kontrolleras regelbundet, helst dagligen, och får inte variera med mer än 10 % under hela testet. En flödeshastighet som motsvarar minst fem testkärlsvolymer per 24 timmar har konstaterats vara lämplig (2).

1.7 FÖRFARANDE

I litteraturen finns information om kapaciteten hos toxicitetstest på fiskembryon och säckyngel. Ett antal exempel på litteratur finns i hänvisningarna (7), (8), (9).

1.7.1 **Exponeringsförhållanden**

1.7.1.1 *Varaktighet*

Testet bör helst inledas inom 30 minuter efter befruktning av äggen. Embryona läggs i testlösningen före eller så snart som möjligt efter att blastocysten påbörjar klyvning, och under alla omständigheter innan gastrulastadiet inleds. Om äggen kommer från en kommersiell leverantör kan det hända att det inte är möjligt att starta testet strax efter befruktningen. Testets känslighet kan allvarligt påverkas av en försenad teststart. Testet måste inledas inom åtta timmar efter befruktningen. Eftersom ynglen inte utfodras under exponeringsperioden, bör testet avslutas strax innan någon av gulesäckarna i något av testkarlen har absorberats helt eller innan ynglen i kontrollgrupperna börjar dö på grund av svält. Testperiodens längd beror på den art som används. Vissa rekommendationer gällande testperiodens längd finns i tilläggen 2 och 3.

1.7.1.2 *Fisktäthet*

Antalet befruktade ägg vid testperiodens början bör vara tillräckligt med tanke på statistiska krav. Äggen fördelas slumpmässigt mellan behandlingsgrupperna. För varje koncentration används minst 30 befruktade ägg, jämnt fördelade (eller så jämnt det är möjligt – med vissa arter är det svårt att få likadana satser) mellan minst tre likadana testkärl. Fisktätheten (biomassa per volym testlösning) får inte vara högre än att man kan hålla koncentrationen löst syrgas på minst 60 % ASV utan luftning. För genomflödestest rekommenderas en fisktäthet som inte överskrider 0,5 g/l per 24 timmar och som under inga omständigheter överskrider 5 g/l lösning (2).

1.7.1.3 *Ljus och temperatur*

Ljusperioden och vattentemperaturen bör anpassas till den art som testas (tilläggen 2 och 3). Temperaturövervakningen kan gärna ordnas med hjälp av ett extra testkärl.

▼B

1.7.2 **Testkoncentrationer**

I regel krävs fem koncentrationer av testämnet. Koncentrationerna bör ligga i en serie med en konstant faktor som inte överskrider 3,2. När man väljer testkoncentrationsområde är det viktigt att beakta kurvan som visar sambandet mellan LC_{50} och exponeringsperioden vid test avseende akut toxicitet. I vissa fall kan det vara motiverat med mindre än fem koncentrationer, t.ex. vid gränstest, och ett snävare koncentrationsintervall. Om mindre än fem koncentrationer används måste detta motiveras. Ämneskoncentrationer som är högre än LC_{50} under 96 timmar eller 100 mg/l, beroende på vilken som är lägre, behöver inte testas. Ämnen får inte testas ovanför sin löslighetsgräns i testvattnet.

Om en lösningsagent används för att underlätta beredningen av testlösningar (se avsnitt 1.6.6) får agentens slutkoncentration i testkärlet inte överskrida 0,1 ml/l och samma slutkoncentration bör användas i alla testkärl.

1.7.3 **Kontrollsatser**

En kontrollsats med spädvatten (med tillämpliga replikat) och, om det är relevant, en kontrollsats med lösningsagenten (med tillämpliga replikat) bör köras utöver testserierna.

1.7.4 **Frekvensen för analytiska bestämningar och mätningar**

Under testets gång bör testämnets koncentrationer bestämmas med regelbundna intervall.

Vid halvstatiskt test, där testämnets koncentration bör hållas inom ± 20 % av den nominella koncentrationen (dvs. inom området 80–120 %, se avsnitten 1.4 och 1.6.6), rekommenderas att de högsta och lägsta testkoncentrationerna åtminstone analyseras strax efter beredningen och strax före förnyandet vid minst tre tillfällen som är jämnt fördelade över testperioden (analyserna görs på ett prov av samma lösning – när den är nyberedd och när den förnyas).

Om det är förväntat att testämnets koncentration inte kommer att hållas inom ± 20 % av den nominella koncentrationen (på grundval av stabilitetsdata om ämnet) måste alla testkoncentrationer analyseras, när de är nyberedda och när de förnyas, men enligt samma schema (dvs. vid minst tre tillfällen som är jämt fördelade över hela testperioden). Bestämning av testämnets koncentration före förnyandet behöver bara göras på ett replikatkärl per testämneskoncentration. Intervallet mellan bestämningarna får inte vara längre än sju dagar. Det rekommenderas att resultaten grundar sig på de uppmätta koncentrationerna. Om det däremot finns bevis för att testämnets koncentration i lösningen på ett tillfredsställande sätt har hållits inom ± 20 % av den nominella eller uppmätta startkoncentrationen under hela testperioden, kan resultaten grunda sig på nominella eller uppmätta startvärden.

Vid genomflödestest kan man lämpligen använda samma provtagningsschema som för halvstatiskt test (även om mätningen av ”gammal” lösning då inte är tillämplig). Om testperioden sträcker sig över mer än sju dagar kan det vara tillrådligt att utöka antalet provtagningstillfällen under den första veckan (t.ex. tre mätningsomgångar) för att kontrollera att testkoncentrationerna hålls stabila.

▼B

Proverna kan behöva centrifugeras eller filtreras (t.ex. med porstorlek 0,45 μm). Eftersom det inte alltid är möjligt att separera den icke-biotillgängliga fraktionen av testämnet från den biotillgängliga fraktionen genom centrifugering eller filtrering bör emellertid dessa behandlingar undvikas.

Under testets förlopp mäts upplöst syrgas, pH och temperatur i alla testkärl. Totalhårdhet och salthalt (om relevant) mäts i kontrollsatserna och i ett kärl med den högsta koncentrationen. Upplöst syrgas och salthalt (om relevant) mäts minst tre gånger (vid testets början, mitt och slut). Vid halvstatiskt test rekommenderas att upplöst syrgas mäts oftare, helst före och efter varje vattenförnyelse eller minst en gång i veckan. Vid halvstatiskt test mäts pH i början och i slutet av varje vattenförnyelse och vid genomflödestest minst varje vecka. Hårdheten mäts en gång per test. Temperaturen bör mätas dagligen och helst övervakas kontinuerligt i minst ett testkärl.

1.7.5 **Observationer**

1.7.5.1 *Stadiet för embryonal utveckling*

Det embryonala stadium (dvs. gastrulastadium) som råder när exponeringen för testämnet inleds bör bekräftas så exakt som möjligt. Detta kan göras på ett representativt prov av ägg som har förvarats på lämpligt sätt. Även litteratur kan konsulteras i fråga om beskrivning och illustration av de embryonala stadierna (2), (5), (10) och (11).

1.7.5.2 *Kläckning och överlevnad*

Observationer av kläckning och överlevnad bör göras minst en gång per dag. Alla antal bör registreras. Det kan vara önskvärt med tätare observationer i början av testperioden (t.ex. med 30 minuters intervall under de tre första timmarna) eftersom överlevnadstiderna i vissa fall kan ha större relevans än blotta antalet dödsfall (t.ex. när det förekommer akuta toxiska verkningar). Döda embryon och yngel bör avlägsnas så snart de observeras, eftersom förruttnelse kan ske snabbt. Yttersta försiktighet bör iakttas när döda individer avlägsnas så att man inte slår till eller orsakar fysiska skador på närliggande ägg eller yngel eftersom de är extremt sköra och känsliga. Kriterierna för död varierar beroende på levnadsstadium:

— **Ägg**: särskilt i tidiga stadier en tydligt förlust av genomskinlighet och färgförändringar orsakade av koagulering eller utfällning av protein, vilket leder till ett vitt ogenomskinligt utseende.

— **Embryon**: avsaknad av kroppsrörelse, avsaknad av hjärtslag eller ogenomskinlig missfärgning hos arter vars embryon normalt är genomskinliga.

— **Yngel**: orörlighet, avsaknad av andningsrörelse, avsaknad av hjärtslag, vit ogenomskinlig färgning av centrala nervsystemet eller avsaknad av reaktion på mekanisk stimulering.

▼B

1.7.5.3 *Onormalt utseende*

Gulesäckens absorptionsstadium och antalet yngel som har onormal kroppsform eller pigmentering bör registreras med intervall vars längd bestäms enligt testperiodens längd och karaktären hos de abnormaliteter det gäller. Man bör beakta att onormala embryon och yngel även förekommer av naturliga skäl, och kan för vissa arter uppgå till flera procent i kontrollgruppen (kontrollgrupperna). Onormala djur bör inte avlägsnas från testkärlet förrän de har dött.

1.7.5.4 *Onormalt beteende*

Abnormaliteter, t.ex. hyperventilation, okoordinerat simmande och atypisk passivitet bör registreras med intervall vars längd bestäms enligt testperiodens längd. Sådana verkningar kan vara svåra att kvantifiera men kan, när de observeras, vara till hjälp vid tolkningen av dödlighetsdata, dvs. ge upplysningar om ämnets toxiska verkningssätt.

1.7.5.5 *Längd*

Vid testets slut rekommenderas matning av individuella längder. Om det förekommer röta på stjärtfenan eller frätning av fenorna bör standardlängder användas. I ett väl utfört test bör variationskoefficienten med avseende på längden hos replikaten i kontrollgrupperna i regel vara $\leq$ 20 %.

1.7.5.6 *Vikt*

Vid testets slut kan individuella vikter bestämmas. Härad är torrvikt (24 timmar vid 60 ^{o}C) att föredra framför våtvikt (avtorkning). I ett väl utfört test bör variationskoefficienten med avseende på vikt för replikaten i kontrollgrupperna i regel vara $\leq$ 20 %.

Från dessa observationer fås följande data, till alla delar eller delvis, för statistisk analys:

— Kumulativ mortalitet.

— Antalet friska yngel vid försökets slut.

— Tidpunkten för kläckningens början och slut (dvs. kläckning till 90 % i varje replikat).

— Antalet yngel som kläcks per dag.

— Längd (och vikt) för överlevande djur vid testets slut.

— Antalet yngel som är missbildade eller har onormalt utseende.

— Antalet yngel som beter sig onormalt.

▼B

2. **DATA OCH RAPPORTERING**

2.1 BEHANDLING AV RESULTATEN

Det rekommenderas att en statistiker deltar i både utformning och analys av testet, eftersom metoden medger betydande variationer i fråga om testutformning, t.ex. antalet testkärl, antalet testkoncentrationer, ursprungligt antal befruktade ägg och vilka parametrar som mäts. Med hänvisning till de många alternativen för testutformning ges inga specifika anvisningar om statistiska procedurer.

Om man avser att uppskatta LOEC- eller NOEC-värden är det nödvändigt att analysera variationerna inom varje replikatgrupp med hjälp av variansanalys (ANOVA) eller kontingenstabellprocedurer. För multipla jämförelser mellan resultaten vid enskilda koncentrationer och resultaten för kontrollgrupperna kan Dunnetts metod rekommenderas (12), (13). Det finns också exempel på andra användbara metoder (14), (15). Storleken på den verkan som kan detekteras med hjälp av ANOVA eller andra procedurer (dvs. testets kapacitet) beräknas och rapporteras. Anmärkningsvis kan konstateras att analys med ANOVA inte lämpar sig för alla observationer som uppräknas i avsnitt 1.7.5.6. Kumulativ mortalitet och antalet friska yngel i slutet av testet kan t.ex. analyseras med probitmetoder.

Om man avser att uppskatta värden på LC eller EC_x bör en eller flera kurvor, t.ex. logistisk kurva, anpassas till relevanta data med hjälp av en statistisk metod, t.ex. minsta kvadrat-metoden eller ickelinjär minsta kvadratmetod. Kurvan (kurvorna) parametriseras så att relevanta värden på LC eller EC_x och motsvarande standardfel kan uppskattas direkt. Därigenom underlättas beräkningen av konfidensintervallet kring LC eller EC_x betydligt. Tvåsidig konfidens på 95 % bör tillämpas, utom när det finns goda skäl för att föredra avvikande konfidensnivåer. Anpassningsproceduren bör helst ge tillgång till ett medel för bedömning av signifikansen eller bristen på signifikans. Grafiska metoder för kurvanpassning kan användas. Regressionsanalys är lämplig för alla observationer som uppräknas i avsnitt 1.7.5.6.

2.2 TOLKNING AV RESULTATEN

Resultaten bör tolkas med försiktighet när de uppmätta koncentrationerna av det toxiska ämnet i testlösningen ligger på nivåer nära analysmetodens detektionsgräns. Likaså bör man vara försiktig vid tolkning av resultaten när det galler koncentrationer ovanför ämnets vattenlöslighetsgräns.

2.3 TESTRAPPORT

Testrapporten ska innehålla nedan angivna uppgifter.

2.3.1 **Testämne:**

— Aggregationstillstånd och relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper.

— Kemiska identifieringsdata, inklusive renhet och i tillämpliga fall analysmetod för kvantificering av testämnet.

▼B

2.3.2 **Testdjur:**

— Vetenskapligt namn, stam, antalet föräldrafiskar (dvs. hur många honor som behövdes för produktion av det antal ägg som användes i testet), ursprung, metoden för insamling av befruktade ägg och efterföljande behandling av äggen.

2.3.3 **Testförhållanden:**

— Testförfarande som har använts (t.ex. halvstatiskt test eller genomflödestest, tiden mellan befruktningen och testets början, fisktäthet osv.).

— Ljusperiod(er).

— Testets utformning (t.ex. antalet testkärl och replikat, antalet embryon per replikat).

— Metoden för beredning av stamlösningar och förnyelsefrekvensen (i förekommande fall bör även lösningsagenten och dess koncentration anges).

— Nominella testkoncentrationer, uppmätta värden, deras medelvärden och standardavvikelser i testkärlen och den metod med vilken dessa erhölls. Om testämnet är vattenlösligt vid koncentrationer under de testade, måste man bevisa att mätningarna hänför sig till testämnets koncentrationer i lösningen.

— Spädvattnets egenskaper: pH, hårdhet, koncentrationen upplöst syrgas, restklornivåer (om de har uppmätts), totalt organiskt kol, partikelinnehåll, testmediets salthalt (om den har uppmätts) och resultatet av alla övriga mätningar.

— Vattenkvaliteten i testkärlen: pH, hårdhet, temperatur och halten upplöst syrgas.

2.3.4 **Resultat:**

— Resultaten från eventuella preliminära test gällande testämnets stabilitet.

— Bevis för att kontrollgrupperna uppfyller normerna för total överlevnad för testdjur (tilläggen 2 och 3).

— Data om mortalitet och överlevnad på embryo- och yngelstadiet och total mortalitet och överlevnad.

— Antalet dagar fram till kläckning och antalet kläckta ägg.

— Data om längd (och vikt).

— Förekomst och beskrivning av morfologiska abnormaliteter (i förekommande fall).

— Förekomst och beskrivning av verkningar pä beteendet (i förekommande fall).

— Statistisk analys och behandling av data.

— För test som analyseras med hjälp av ANOVA bör man rapportera den lägsta koncentration vid vilken verkningar observeras (LOEC) vid p = 0,05 och den koncentration vid vilken inga verkningar observeras (NOEC) för varje respons som har varit föremål för bedömning, tillsammans med en beskrivning av de statistiska procedurer som har använts och angivelse av hur stark verkan som kunde detekteras.

▼B

— För test som har analyserats med hjälp av regressionstekniker bör man ange LC eller EC_x, konfidensintervall och en kurva med den anpassade modell som har använts för beräkningen.

— Motiveringar för varje avvikelse från denna testmetod.

3. **HÄNVISNINGAR**

(1) Kristensen P. (1990), Evaluation of the Sensitivity of Short Term Fish Early Life Stage Tests in Relation to other EELS Test Methods. Final report to the Commission of the European Communities, 60 sidor, juni 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 sidor.

(3) Brauhn J. L. and Schoettger R. A. (1975), Acquisition and Culture of Research Fish: Rainbow trout, Fathead minnows, Channel Catfish and Bluegills. s. 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, s. 121–173.

(6) Legault R. (1958), A Technique for Controlling the Time of Daily Spawning and Collecting Eggs of the Zebrafish, *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan) Copeia, 4, s. 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, s. 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, s. 807–821.

(9) Van Leeuwen C. J., Espeldoorn 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, s. 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 sidor.

(12) Dunnett C. W. (1955), A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with Control. J. Amer. Statist. Assoc, 50, s. 1096–1121.

(13) Dunnett C. W. (1964), New Tables for Multiple Comparisons with a Control. Biometrics, 20, s. 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 Hermes J. (1990), Quantitative Structure-Activity Relationships for Fish Early Life Stage Toxicity. Aquatic Toxicology, 16, s. 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 I/RM/28, December 1992, 81 sidor.

(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, s. 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, 252, s. 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, s. 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., McIntyre 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, s. 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. (1985), Early life history of fishes: New developmental, ecological and evolutionary perspectives, Junk Publ., Dordrecht, 280 sidor.

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, s. 1–58.

Tabell 1A

Fiskarter som rekommenderas för testning

Sötvatten
Oncorhynchus mykis Regnbågslax (9), (16)
Danio rerio Sebrafisk (7), (17), (18)
Cyprinus caprio Karp (8), (19)
Oryzias latipes Japanese ricefish/Medaka (20), (21)
Pimephales promelas Fathead minnow (8), (22)

▼B

Tabell 1B

Exempel på övriga väldokumenterade arter som också har använts

Sötvatten	Saltvatten
Carassius auratus Guldfisk (8)	*Menidia peninsulae* Tidewater silverside (23), (24), (25)
Lepomis *macrochirus* Solaborre (”Bluegill”) (8)	*Clupea harengus* Sill (24), (25)
	Gadus rnorhua Torsk (24), (25)
	Cyprinodon variegatus Sheepshead minnow (23), (24), (25)

▼B

Bilaga 1

ANVISNINGAR FÖR TOXICITETSTEST PÅ EMBRYON OCH SÄCKYNGEL AV SEBRAFISK *(BRACHYDAMO RERIO)*

INLEDNING

Sebrafisken härstammar från indiska Coromandel-kusten där den lever i snabbströmmande vatten. Den är en vanlig akvariefisk som tillhör karpfamiljen. Information om vård och odling finns i allmänt tillgängliga referensböcker om tropiska fiskar. En översikt över sebrafiskens biologi och användning för fiskforskning har sammanställts av Laale (1).

Fisken blir sällan längre än 45 mm. Den har en cylinderformad kropp med 7–9 mörkblå silverskiftande strimmor. Strimmorna löper in i stjärt- och analfenorna. Ryggen är olivgrön. Hanarna är slankare än honorna. Honorna är mer silverskiftande och har en svällande buk, särskilt före romläggningen.

Vuxna exemplar klarar av stora variationer i temperatur, pH och vattenhårdhet. För att få friska exemplar som producerar ägg av god kvalitet bör man dock se till att betingelserna är optimala.

Vid romläggningen följer hanen efter honan och trycker sig mot henne, och äggen befruktas efterhand som de kommer ut. Äggen, som är genomskinliga och icke-vidhäftande, faller till botten där de i vissa fall kan bli uppätna av föräldrarna. Romläggningen påverkas av ljus. Om morgonljuset är tillräckligt lägger fisken i regel sin rom under de första timmarna efter soluppgången.

En hona kan producera satser om hundratals ägg med en veckas intervall.

BETINGELSER FÖR FÖRÄLDRAGENERATIONEN, REPRODUKTION OCH TIDIGA LEVNADSSTADIER

Ett antal friska exemplar väljs ut och hålls i lämpligt vatten (se t.ex. tillägg 4) under minst två veckor före planerad romläggning. Fiskgruppen bör ha producerat minst en sats avkomma innan den producerar de ägg som används för testet. Fisktätheten under denna period får inte överskrida 1 gram fisk per liter. Om vattnet byts regelbundet eller om det finns ett reningssystem kan högre täthet tillåtas. Temperaturen i förvaringskärlen bör hållas på 25 ± 2 °C. Fisken bör få varierande foder, såväl vanligt torrfoder som levande foder, t.ex. nyckläckta artemia, mygglarver, daphnia och vita maskar (enkyträer).

Nedan beskrivs två förfaranden som i praktiken har gett tillräcklig mängd friska och befruktade ägg för testningsändamål:

i) 8 hanar och 16 honor placeras i en behållare som innehåller 50 liter spädvatten. Behållaren bör vara avskärmad från direkt ljus och lämnas så ostörd som möjligt i minst 48 timmar. På eftermiddagen till den dag som föregår testets början placeras en romläggningsbricka på akvariets botten. Romläggningsbrickan består av en ram (plexiglas eller annat lämpligt material) som är 5–7 cm hög med ett grovt nät (2–5 mm) fäst upptill och ett fint nät (10–30 μm) nedtill. Ett antal ”romläggningsträd” av otvinnat nylonrep fästes vid det grova nätet. Efter att fiskarna har hållits i mörker i 12 timmar utsätts de för ett svagt ljus som stimulerar till romläggning. Två till fyra timmar efter romläggningen tas romläggningsbrickan bort och äggen samlas in. Romläggningsbrickan hindrar fiskarna från att äta upp äggen och underlättar samtidigt insamling av äggen. Fiskgruppen bör ha lagt rom minst en gång innan den lägger den rom som används för testet.

▼B

ii) 5–10 hanar och honor förvaras separat i minst två veckor före den planerade romläggningen. Efter 5–10 dagar har honorna uppsvälld buk och deras genitalpapiller är synliga. Hanfiskarna har inga papiller. Romläggningen utförs i romläggningsbehållare med natförsedd botten (se ovan). Behållaren fylls med spädvatten så att vattendjupet ovanför nätet är 5–10 cm. En hona och två hanar placeras i behållaren två dagar före den planerade romläggningen. Vattentemperaturen ökas stegvis till ett värde som är en grad högre än acklimatiseringstemperaturen. Ljuset släcks och behållarna lämnas så ostörda som möjligt. På morgonen tänds ett svagt ljus för att stimulera romläggningen. Efter 2–4 timmar tas fiskarna bort och äggen samlas in. Om det behövs större äggmängder än en hona kan producera kan man använda tillräckligt antal parallella romläggningsbehållare. De enskilda honornas reproduktionskapacitet registreras före testet (satsens storlek och kvalitet) för att ge möjlighet att välja ut honorna med de bästa reproduktionsegenskaperna för romläggningen.

Äggen överförs till testkärlen med hjälp av glasrör (innerdiameter minst 4 mm) som är försedda med en mjuk sugboll. Vid överföring av äggen bör den medföljande vattenmängden vara så liten som möjligt. Äggen är tyngre än vatten och sjunker ut ur röret. Det är viktigt att se till att ägg (och yngel) inte kommer i kontakt med luft. Ett eller flera prover av satsen eller satserna undersöks i mikroskop för att kontrollera att det inte förekommer irregulariteter i de första utvecklingsstadierna. Det är inte tillåtet att desinfektera äggen.

Mortaliteten för äggen är högst under de första 24 timmarna efter befruktningen. Under denna period är det vanligt med en mortalitet på 5–40 %. Äggen kan degenerera till följd av misslyckad befruktning eller utvecklingsstörningar. Äggens kvalitet verkar bero på fiskhonan, eftersom vissa honor genomgående producerar ägg av god kvalitet medan andra aldrig gör det. Även utvecklingshastigheten och kläckningshastigheten varierar mellan olika satser. Framgångsrikt befruktade ägg och säckyngel överlever till stor del, i regel över 90 %. Vid 25 ^{o}C kläcks äggen 3–5 dagar efter befruktningen och gulesäcken har absorberats cirka 13 dagar efter befruktningen.

Den embryonala utvecklingen har definierats väl av Hisaoka och Battle (2). Äggen och nykläckta yngel är genomskinliga och därför kan man följa med fiskens utveckling och observera eventuella missbildningar. Cirka fyra timmar efter romläggningen kan man se skillnaden mellan obefruktade ägg och befruktade ägg (3). För denna undersökning placeras ägg och yngel i små testkärl och granskas under mikroskop.

De testbetingelser som bör användas för de tidiga levnadsstaderna uppräknas i tillägg 2. Optimala värden för pH och spädvattnets hårdhet är 7.8 respektive 250 mg $CaCO_3$/l.

BERÄKNINGAR OCH STATISTIK

En tvåstegsmetod rekommenderas. Först görs en statistisk analys av data gällande mortalitet, onormal utveckling och kläckningstid. Därefter görs en statistisk utvärdering av kroppslängden hos de exemplar som behandlats i koncentrationer vid vilka inga skadliga verkningar på någon av de nämnda parametrarna har detekterats. Denna metod rekommenderas eftersom ett toxiskt ämne selektivt kan döda mindre fisk, förlänga kläckningstiden och framkalla grova missbildningar, vilket leder till missvisande längdmätningsresultat. Dessutom mäts ungefär samma antal fiskar per behandling, vilket säkerställer de statistiska resultatens giltighet.

▼B

BESTÄMNING AV LC_{50} OCH EC_{50}

Procentandelen överlevande ägg och yngel beräknas och korrigeras för mortaliteten i kontrollgrupperna, enligt Abbotts formel (4):

$$P = 100 - \left(\frac{C - P'}{C} \times 100\right)$$

där:

P = korrigerad procentandel överlevande,

P' = procentandel överlevande som observerats i testkoncentrationen,

C = procentandelen överlevande i kontrollgruppen.

I mån av möjlighet bestäms LC_{50} vid testets slut med en lämplig metod.

Anvisningar för hur man kan få in morfologiska abnormaliteter i EC_{50}-statistiken har publicerats av Stephan (5).

UPPSKATTNING AV LOEC OCH NOEC

Ett av syftena med testet på ägg och säckyngel är att jämföra koncentrationer över noll med kontrollgruppens koncentrationer, dvs. att bestämma värdet på LOEC. Därför bör förfaranden med multipeljämförelse användas (6), (7), (8), (9). (10).

HÄNVISNINGAR

1. Laale FE W. (1977), The Biology and Use of the Zebrafish *(Brachydanio rerio)* in Fisheries Research. A Literature Review. J. Fish Biol. 10, s. 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 sidor.

3. Nagel R. (1986), Untersuchungen zur Elproduktion beim Zebrabärbling *(Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan). Journal of Applied Ichthyology, 2, s. 173–181.

4. Finney D. J. (1971), Probit Analysis, 3rd cd., Cambridge University Press, Great Britain, s. 1–333.

5. Stephan C. E. (1982), Increasing the Usefulness of Acute Toxicity Tests. Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Fifth Conference, ASTM STP 766, J. G. Pearson, R. B, Foster and W. E. Bishop, Eds., American Society for Testing and Materials, s. 69–81.

6. Dunnett C. W. (1955), A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with a Control.). Amer. Statist. Assoc, 50, s. 1096–1121.

7. Dunnett C. W. (1964), New Tables for Multiple Comparisons with a Control. Biometrics, 20, s. 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, s. 103–117.

9. Williams D. A. (1972), The Comparison of Several Dose Levels with a Zero Dose Control. Biometrics 28, s. 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.

▼B

Bilaga 2

TESTBETINGELSER, TESTPERIOD OCH ÖVERLEVNADSKRITERIER FÖR REKOMMENDERADE ARTER

Arter	Temperatur (°C)	Salthalt (0/00)	Ljusperiod (timmar)	Stadierna s längd (dagar)		Typisk testperiod	Överlevnad i kontrollgrupper, (minimum %)	
				Embryo	Säckyngel		Kläcknings-framgång	Efter kläckning
SÖTVATTEN								
Brachydanio rerio Sebrafisk	25 ± 1	—	12–16	3–5	8–10	Så snart som möjligt efter befruktning (tidigt gastrula-stadium) till fem dagar efter kläckning (8–10 dagar)	80	90
Oncorhvnchus mykiss Regnbågslax	10 ± 1 (1) 12 ± 1 (2)	—	0 (a)	30–35	25–30	Så snart som möjligt efter befruktning (tidigt gastrula-stadium) till 20 dagar efter kläckning (50–55 dagar)	66	70
Cyprinus carpio Karp	21–25	—	12–16	5	> 4	Så snart som möjligt efter befruktning (tidigt gastrula-stadium) till 4 dagar efter kläckning (8–9 dagar)	80	75
Oryzias *latipes Japanese* ricefish/Medaka	24 ± 1 (1) 23 ± 1 (2)	—	12–16	8–11	4–8	Så snart som möjligt efter befruktning (tidigt gastrula-stadium) till 5 dagar efter kläckning (13–16 dagar)	80	80
Pimephales *promelas* Fathead minnow	25 ± 2	—	16	4–5	5	Så snart som möjligt efter befruktning (tidigt gastrula-stadium) till 4 dagar efter kläckning (8–9 dagar)	60	70

(1) För embryon.
(2) För yngel.
(a) Mörker for embryon och yngel tills att det gått en vecka efter kläckning, utom när de inspekteras. Därefter dämpad belysning till testets slut.

▼B

Bilaga 3

Testsbetingelser, testperiod och överlevnadskriterier för andra väldokumenterade arter

Arter	Temperatur (°C)	Salthalt (0/00)	Ljusperiod (timmar)	Stadiernas längd (dagar)		Typisk period för test på embryo och säckyngel	Överlevnad i kontrollgrupper (minimum %)	
				Embryo	Test på säckyngel		Kläcknings-framgång	Efter kläckning
SÖTVATTEN								
Carassius auratus Guldfisk	24 ± 1	—	—	3–4	> 4	Så snart som möjligt efter befruktning (tidigt gastrula-stadium) till 4 dagar efter kläckning (7 dagar)	—	80
Leopomis macrochirus Blugill sunfish	21 ± 1	—	16	3	> 4	Så snart som möjligt efter befruktning (tidigt gastrula-stadium) till 4 dagar efter kläckning (7 dagar)	—	75
SALTVATTEN								
Menidia peninsulae Tidewater silverside	22–25	15–22	12	1,5	10	Så snart som möjligt efter befruktning (tidigt gastrula-stadium) till 5 dagar efter kläckning (6–7 dagar)	80	60
Clupea harengus Sill	10 ± 1	8–15	12	20–25	3–5	Så snart som möjligt efter befruktning (tidigt gastrula-stadium) till 3 dagar efter kläckning (23–27 dagar)	60	80
Gadus morhua Torsk	5 ± 1	5–30	12	14–16	3–5	Så snart som möjligt efter befruktning (tidigt gastrula-stadium) till 3 dagar efter kläckning (18 dagar)	60	80
Cyprinodon variegatus Sheepshead minnow	25 ± 1	15–30	12	—	—	Så snart som möjligt efter befruktning (tidigt gastrula-staditim) till 4 eller 7 dagar efter kläckning (28 dagar)	> 75	80

02008R0440 — SV — 18.05.2017 — 007.001 — 1354

▼B

BILAGA 4

NÅGRA KEMISKA EGENSKAPER FÖR GODTAGBART SPÄDVATTEN

Ämne	Koncentrationer
Partikelinnehåll	< 20 mg/l
Totalt organiskt kol	< 2 mg/l
Ojoniserad ammoniak	< 1 µg/l
Restklor	< 10 µg/l
Total mängd bekämpningsmedel typ organiska fosforföreningar	< 50 ng/l
Total mängd bekämpningsmedel typ organiska klorföreningar samt poly-klorerade bifenyler	< 50 ng/l
Total mängd organiskt bundet klor	< 25 ng/l

▼B

C.16 HONUNGSBIN – TEST AVSEENDE AKUT TOXICITET (ORALT)

1. METOD

Denna testmetod för akut toxicitet motsvarar OECD TG 213 (1998).

1.1 INLEDNING

Detta test är en laboratoriemetod for bedömning av växtskyddsprodukters och andra kemikaliers akuta toxicitet (oralt) på vuxna arbetsbin.

Vid bedömning och utvärdering av olika ämnens toxiska egenskaper kan det vara nödvändigt att bestämma den akuta toxiciteten (oralt) på honungsbin, t.ex. när det är sannolikt att bin kommer att exponeras för en viss kemikalie. Testet för akut toxicitet (oralt) används för att bestämma bekämpningsmedels och kemikaliers toxicitet för bin. Resultatet av detta test används för att avgöra om det behövs ytterligare utvärderingar. Metoden kan särskilt användas i stegvisa program för bedömning av de risker som bekämpningsmedel kan medföra för bin. Dessa program bygger på en sekventiell arbetsgång från laboratorietoxicitetstest till semifält- och fältförsök (1). Bekämpningsmedel kan testas som verksamma ämnen eller som formulerade produkter.

En giftekvivalent bör användas för att fastställa binas känslighet och testförfarandets noggrannhet.

1.2 DEFINITIONER

Akut toxicitet (oralt): de skadliga verkningar som uppträder inom en period på högst 96 timmar efter oral tillförsel av en engångsdos av testämnet.

Dos: den mängd testämne som tillförs. Dosen uttrycks som vikten (μg) testämne per försöksdjur (μg/bi). Den faktiska dosen per enskilt bi kan inte beräknas eftersom bina matas kollektivt, men det går att uppskatta en genomsnittsdos (total konsumtion av testämnet dividerat med antalet testbin i en bur).

LD_{50} (median letal dose) oralt: en statistiskt fastställd engångsdos av ett ämne som kan förväntas leda till döden för 50 % av de djur som fått dosen på oral väg. LD_{50}-värdet uttrycks som μg testämne per bi. När det gäller bekämpningsmedel kan testämnet vara ett verksamt ämne eller en formulerad produkt som innehåller ett eller flera verksamma ämnen.

Mortalitet: ett djur registreras som dött när det är helt orörligt.

1.3 PRINCIP FÖR TESTMETODEN

Vuxna arbetsbin honungsbi (Apis *mellifera)* exponeras för en serie doser av testämnet som dispergerats i sackaroslösning. Därefter utfodras bina med samma foder, men utan tillsats av testämne. Mortaliteten registreras dagligen under minst 48 timmar och jämförs med kontrollgruppens värden. Om mortaliteten ökar under perioden 24–48 timmar efter tillförseln, medan kontrollgruppens mortalitet hålls på en godtagbar nivå, dvs. < 10 %, bör testet förlängas till högst 96 timmar. Resultaten analyseras för beräkning av LD_{50} vid 24 och 48 timmar och, om testet har förlängts, även vid 72 och 96 timmar.

▼B

1.4 TESTETS GILTIGHET

För att testet ska vara giltigt måste följande villkor uppfyllas:

— Genomsnittsmortaliteten för det totala antalet kontrolldjur får inte överskrida 10 % vid testets slut.

— De värden som erhålls for LD_{50} för giftekvivalenterna ska ligga inom det specificerade området.

1.5 BESKRIVNING AV TESTMETODEN

1.5.1 **Insamling av bin**

För testet används unga vuxna arbetsbin av samma ras, ålder, näringstillstånd osv. Bina tas från adekvat utfodrade, friska, så långt som möjligt sjukdomsfria samhällen med renrasiga drottningar med känd historia och fysiologisk status. Bina bör samlas in på testdagens morgon eller kvällen före testet och hållas i testförhållandena fram till följande dag. Bin som insamlats från yngelfria ramar rekommenderas. Insamling tidigt på våren eller sent på hösten bör undvikas eftersom bina då har genomgått fysiologiska förändringar. Om ett test måste genomföras tidigt pä våren eller sent på hösten kan bina kläckas i en inkubator och födas upp med ”bibröd” (pollen som insamlats från vaxkakan) och sackaroslösning under en vecka. Bin som har behandlats med kemiska ämnen såsom antibiotika, varroabekämpningsmedel osv. får inte användas för toxicitetstest förrän det har gått fyra veckor från att den sista behandlingen avslutades.

1.5.2 **Förvarings- och utfodringsförhållanden**

Burarna bör vara enkla att rengöra och välventilerade. De kan vara tillverkade i t.ex. rostfritt stål, nät eller plast. Även träburar för engångsbruk kan användas. Grupper om tio bin per bur rekommenderas. Burarnas storlek bör anpassas efter antalet bin och vara tillräckligt rymliga.

Bina hålls i mörker i ett testrum med en temperatur på 25 ± 2 °C. Den relativa fuktigheten, i regel kring 50–70 %, registreras under hela testförloppet. Hanteringen, såsom behandling och observationer, kan däremot genomföras i (dags)ljus. Som foder ges sackaroslösning i vatten med en slutkoncentration på 500 g/l (50 % vikt per volym). Efter tillförsel av testdoserna ges bina fri tillgång till foder. Utfodringssystemet bör vara utformat på sådant sätt att foderkonsumtionen per bur kan registreras (se avsnitt 1.6.3.1). För utfodringen kan ett cirka 50 mm långt och 10 mm brett glasrör användas, vars öppna ända smalnar av till en diameter på cirka 2 mm.

1.5.3 **Förberedelse av bina**

De insamlade bina fördelas slumpvis i testburarna som placeras ut slumpvis i testrummet.

▼B

Bina kan hållas utan foder i upp till 2 timmar före testets början. Det rekommenderas att bina inte ges foder före behandlingen för att alla bin ska ha jämförbart tarminnehåll vid testets början. Döende bin avlägsnas och ersätts med friska bin före testets början.

1.5.4 **Förberedelse av doserna**

Om testämnet är vattenlösligt kan det dispergeras direkt i en 50 % sackaroslösning. För tekniska produkter och ämnen med låg vattenlöslighet kan ett organiskt lösningsmedel, emulgeringsämnen eller dispergeringsämnen med låg toxicitet användas som vehikel (t.ex. aceton, dimetylformamid eller dimetylsulfoxid). Vehikelkoncentrationen beror på testämnets löslighet och bör vara densamma för alla testkoncentrationer. I regel är en vehikelkoncentration på 1 % lämplig och denna koncentration bör inte överskridas.

Det behövs också lämpliga kontrollösningar, dvs. om lösningsmedel eller dispergeringsmedel används för att lösa upp testämnet måste två separata kontrollgrupper användas: en som får vattenlösning och en som får sackaroslösning med lösningsmedlet eller vehikeln i samma koncentration som används för doseringslösningarna.

1.6 FÖRFARANDE

1.6.1 **Test- och kontrollgrupper**

Antalet doser och replikat som testas bör väljas så att de uppfyller de statistiska kraven för bestämning av LD_{50} med 95 % konfidensintervall. I regel används fem doser i en geometrisk serie med en faktor på högst 2,2. Doserna bör täcka området för LD_{50}. Utspädningsfaktorn och antalet doskoncentrationer fastställs med beaktande av toxicitetskurvans lutning (dos i förhållande till mortalitet) och den statistiska metod som används för analys av resultaten. Ett preliminärt test kan användas som stöd för valet av lämpliga doskoncentrationer.

Varje testkoncentration bör ges till minst tre likadana testgrupper med tio bin per grupp. Utöver själva testserierna bör minst tre kontrollgrupper med tio bin per grupp också behandlas. Kontrollgrupper bör också användas för eventuella lösningsmedel eller vehiklar som används (se avsnitt 1.5.4).

1.6.2 **Giftekvivalent**

Testserien bör även omfatta en giftekvivalent. Minst tre doser bör väljas på sådant sätt att de täcker det förväntade LD_{50}-värdet. Minst tre likadana burar med tio bin per bur bör användas för varje testdos. Som giftekvivalent rekommenderas dimetoat, vars LD_{50}-värde (oralt, 24 timmar) enligt rapporterade uppgifter ligger inom området 0,10–0,35 µg verksamt ämne per bi (2). Även andra giftekvivalenter kan godtas förutsatt att man har tillgäng till tillräckliga data om förväntad dosrespons (t.ex. paration).

▼B

1.6.3 **Exponering**

1.6.3.1 *Tillförsel av doser*

Varje testgrupp med bin ges 100–200 μl 50 % sackaroslösning i vatten som innehåller den valda koncentrationen av testämnet. För ämnen som har låg löslighet, låg toxicitet eller låg koncentration i formuleringen krävs en större volym, eftersom större proportioner måste användas i sackaroslösningen. Mängden behandlat foder som konsumeras per grupp följs upp. När utfodringsbehållaren är tom (i regel inom 3–4 timmar) tas den ut ur buren och ersätts med en behållare som innehåller ren sackaroslösning. Bina får därefter fri tillgång till sackaroslösning. För vissa ämnen kan högre koncentrationer i testdosen leda till att bina avvisar den och endast konsumerar lite eller inget alls. Efter en period på högst 6 timmar bör okonsumerat behandlat foder ersättas med ren sackaroslösning. Mängden konsumerat behandlat foder uppskattas (t.ex. genom mätning av återstodens volym eller vikt).

1.6.3.2 *Testperiodens längd*

Testet fortsätts i regel i 48 timmar efter det att testlösningen har ersatts med ren sackaroslösning. Om mortaliteten fortsätter att stiga med mer än 10 % efter de första 24 timmarna bör testperioden förlängas (till högst 96 timmar), förutsatt att kontrollgruppens mortalitet inte överskrider 10 %.

1.6.4 **Observationer**

Mortaliteten registreras när det har gått 4 timmar från testets början och därefter vid 24 timmar och 48 timmar efter tillförsel av dosen. Om det behövs en förlängd testperiod görs efterföljande bedömningar med 24 timmars intervall (upp till högst 96 timmar), förutsatt att kontrollgruppens mortalitet inte överskrider 10 %.

En uppskattning görs av mängden behandlat foder som konsumeras per grupp. Genom att jämföra hur stor mängd behandlat och obehandlat foder som har konsumerats inom de angivna 6 timmarna kan man få upplysningar om i vilken grad bina accepterar det behandlade fodret.

Alla avvikelser i beteende som observeras under testperioden bör registreras.

1.6.5 **Gränstest (Limit-test)**

1 vissa fall (t.ex. om ett testämne förväntas ha låg toxicitet) kan gränstest utföras med 100 μg verksamt ämne per bi, i syfte att demonstrera att LD_{50} är högre än detta värde. Förfarandet bör vara detsamma, dvs. tre likadana testgrupper per testdos, relevanta kontrollgrupper, uppskattning av mängden konsumerat behandlat foder och användning av giftekvivalent. Om det förekommer mortalitet bör ett fullständigt test genomföras. Alla eventuella observerade subletala verkningar bör registreras (se avsnitt 1.6.4).

▼B

2. **DATA OCH RAPPORTERING**

2.1 DATA

Alla uppgifter bör sammanställas i en tabell. Av tabellen ska framgå, för varje testgrupp samt för varje kontrollgrupp och varje giftekvivalentgrupp, antalet bin som använts, mortaliteten vid varje observationstidpunkt och antalet bin med ett beteende som tyder på skadliga verkningar. Mortalitetsdata bör analyseras med lämpliga statistiska metoder (t.ex. probit-analys, rörligt medelvärde eller binominal sannolikhet} (3), (4). Dosresponskurvor uppritas för varje rekommenderad observationstidpunkt. Kurvornas lutning och median letal dos (LD_{50}) beräknas med 95 % konfidensintervall. Korrigeringar för kontrollgruppens mortalitet kan göras med hjälp av Abbott-korrigering (4), (5). Om det behandlade fodret inte har konsumerats helt bör man göra en uppskattning av hur stor dos av testämnet som har konsumerats per grupp. LD_{50}-värdet uttrycks som µg testämne per bi.

2.2 TESTRAPPORT

Testrapporten ska innehålla nedan angivna uppgifter.

2.2.1 **Testämne**

— Aggregationstillstånd och relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper (t.ex. stabilitet i vatten, ångtryck).

— Kemiska identifieringsdata, inklusive strukturformel, renhet (för bekämpningsmedel t.ex. identiteten och halten av verksamt ämne eller verksamma ämnen).

2.2.2 **Försöksdjur**

— Vetenskapligt namn. ras, ungefärlig ålder (i veckor), insamlingsmetod, insamlingsdatum.

— Information om de samhällen som används för insamling av testbin, inklusive hälsa, eventuella vuxensjukdomar, eventuella förbehandlingar osv.

2.2.3 **Testförhållanden**

— Temperatur och relativ fuktighet i testrummet.

— Förvaringsförhållanden, inklusive burarnas typ, storlek och material.

— Metoder för beredning av stam- och testlösningar (i förekommande fall anges även lösningsmedlet och dess koncentrationer).

— Testets utformning, t.ex. antal testkoncentrationer och deras värden, antalet kontrollgrupper, samt för varje testkoncentration och kontrollgrupp även antalet replikatburar och antalet bin per bur.

— Testdatum.

▼B

2.2.4 **Resultat**

— Resultaten från preliminära test (i förekommande fall).

— Rådata: mortaliteten för varje testad dos vid varje observationstidpunkt.

— Dos-responskurvorna vid testets slut.

— LD_{50}-värden med 95 % konfidensintervall, vid varje rekommenderad observationstidpunkt, för testämnet och för giftekvivalenten.

— Statistiska metoder som har använts för att bestämma LD_{50}.

— Mortaliteten i kontrollgrupperna.

— Övriga biologiska verkningar som har observerats eller uppmätts, t.ex. om bina har betett sig onormalt (inklusive om de avvisat testdosen), konsumtionen av foder i behandlade och obehandlade grupper.

— Varje avvikelse från de här beskrivna testförfarandena samt all annan relevant information.

3. **HÄNVISNINGAR**

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. s. 151–165, March 1993.

2. Gough, H. j., McIndoe, EX., 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, s. 119–125.

3. Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F. (1949), A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, s. 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, s. 265–267.

▼B

C.17 HONUNGSBIN – TEST AVSEENDE AKUT TOXICITET (KONTAKT)

1. METOD

Denna testmetod för akut toxicitet motsvarar OECD TG 214 (1998).

1.1 INLEDNING

Detta test är en laboratoriemetod för bedömning av växtskyddsprodukters och andra kemikaliers akuta toxicitet (kontakt) på vuxna arbetsbin.

Vid bedömning och utvärdering av de toxiska egenskaperna hos ämnen kan det vara nödvändigt att bestämma den akuta toxiciteten (kontakt) på honungsbin, t.ex. när det är sannolikt att bin kommer att exponeras för en viss kemikalie. Testet för akut toxicitet (kontakt) används för att bestämma bekämpningsmedels och kemikaliers toxicitet för bin. Resultatet av detta test används för att avgöra om det behövs ytterligare utvärderingar. Metoden kan särskilt användas i stegvisa program för bedömning av de risker som bekämpningsmedel kan medföra för bin. Dessa program bygger på en sekventiell arbetsgång från laboratorietoxicitetstest till semifält-och fältförsök (1). Bekämpningsmedel kan testas som verksamma ämnen eller som formulerade produkter.

En giftekvivalent bör användas för att fastställa binas känslighet och testförfarandets noggrannhet.

1.2 DEFINITIONER

Akut toxicitet (kontakt): de skadliga verkningar som uppträder inom en period på högst 96 timmar efter lokal applicering av en engångsdos av testämnet.

Dos: den mängd testämne som appliceras. Dosen uttrycks som vikten (μg) testämne per försöksdjur (μg/bi).

LD_{50} (median letal dose) kontakt: en statistiskt fastställd engångsdos av ett ämne som kan förväntas leda till döden för 50 % av de djur på vilka dosen har applicerats. LD_{50}-värdet uttrycks som μg testämne per bi. När det gäller bekämpningsmedel kan testämnet vara ett verksamt ämne eller en formulerad produkt som innehåller ett eller flera verksamma ämnen.

Mortalitet: ett djur registreras som dött när der är helt orörligt.

1.3 PRINCIP FÖR TESTMETODEN

Vuxna arbetsbin (honungsbin – Apis *mellifera)* exponeras för en serie doser av testämnet upplöst i lämplig vehikel. Exponeringen sker genom direkt applicering på bröstkorgen (droppar). Testperiodens längd är 48 timmar. Om mortaliteten ökar under perioden 24–48 timmar efter tillförseln, medan kontrollgruppens mortalitet hålls på en godtagbar nivå, dvs. < 10 %, bör testet förlängas till högst 96 timmar. Mortaliteten registreras dagligen och jämförs med kontrollgruppens värden. Resultaten analyseras för beräkning av LD_{50} vid 24 och 48 timmar, och om testet förlängs, vid 72 och 96 timmar.

▼B

1.4 TESTETS GILTIGHET

För att testet ska vara giltigt måste följande villkor uppfyllas:

— Genomsnittsmortaliteten för det totala antalet kontrolldjur får inte överskrida 10 % vid testets slut.

— De värden som erhålls för LD_{50} för giftekvivalenten ska ligga inom det specificerade området.

1.5 BESKRIVNING AV TESTMETODEN

1.5.1 **Insamling av bin**

För testet används unga vuxna arbetsbin med samma ålder, näringstillstånd, ras osv. Bina tas från adekvat utfodrade, friska, så långt som möjligt sjukdomsfria samhällen med renrasiga drottningar med känd historia och fysiologisk status. Bina bor samlas in på testdagens morgon eller kvällen före testet och hällas i testförhållandena fram till följande dag. Bin som insamlats från yngelfria ramar rekommenderas. Insamling tidigt på våren eller sent på hösten bör undvikas eftersom bina då har genomgått fysiologiska förändringar. Om test måste genomföras tidigt på våren eller sent på hösten kan bina kläckas i en inkubator och födas upp med ”bibröd” (pollen som insamlats från vaxkakan) och sackaroslösning under en vecka. Bin som har behandlats med kemiska ämnen såsom antibiotika, varroabekämpningsmedel osv. får inte användas för toxicitetstest förrän det har gått fyra veckor från det att den sista behandlingen avslutades.

1.5.2 **Förvarings- och utfodringsförhållanden**

Burarna bör vara enkla att rengöra och välventilerade. Burarna kan vara tillverkade av t.ex. rostfritt stål, nät eller plast. Även träburar för engångsbruk kan användas. Burarnas storlek bör anpassas efter antalet bin och vara tillräckligt rymliga. Grupper om tio bin per bur rekommenderas.

Bina hålls i mörker i ett testrum med en temperatur på 25 ± 2 °C. Den relativa fuktigheten, i regel kring 50–70 %, bör registreras under hela testförloppet. Hanteringen, såsom behandling och observationer, kan däremot genomföras i (dags)ljus. Sackaroslösning i vatten med en slutkoncentration på 500 g/l (50 % vikt per volym) används som foder och tillhandahålls fritt för bina med hjälp av en utfodringsanordning. För utfodringen kan ett cirka 50 mm långt och 10 mm brett glasrör användas, vars öppna ända smalnar av till en diameter på cirka 2 mm.

1.5.3 **Förberedelse av bina**

De insamlade bina kan bedövas med koldioxid eller kväve före appliceringen av testämnet. Mängden bedövningsmedel och exponeringstiden för medlet bör minimeras. Döende bin avlägsnas och ersätts med friska bin före testets början.

1.5.4 **Förberedelse av doserna**

Testämnet appliceras upplöst i en vehikel, t.ex. ett organiskt lösningsmedel eller vattenlösning med ett vätmedel. Som organiskt lösningsmedel rekommenderas aceton men även andra organiska lösningsmedel med låg toxicitet kan användas (t.ex. dimetylformamid, dimetylsulfoxid). I fråga om formulerade produkter som är dispergerade i vatten och mycket polära organiska ämnen som inte är lösliga i organiska vehikellösningsmedel kan lösningarna vara enklare att applicera om de bereds i en svag lösning av ett vanligt vätmedel (t.ex. Agral, Cittowett, Lubrol, Triton eller Tween).

▼B

Lämpliga kontrollösningar bör beredas. I fall där ett lösningsmedel eller ett dispergeringsmedel används för att lösa upp testämnet bör två separata kontrollgrupper användas, en som behandlas med vatten och en som behandlas med lösningsmedlet eller dispergeringsmedlet.

1.6 FÖRFARANDE

1.6.1 **Test- och kontrollgrupper**

Antalet doser och replikat som testas bör väljas så att de uppfyller de statistiska kraven för bestämning av LD_{50} med ett konfidensintervall på 95 %. För testet används i regel fem doser i en geometrisk serie vars faktor inte överskrider 2,2. Doserna bör täcka området för LD_{50}. Antalet doser fastställs med beaktande av toxicitetskurvans lutning (dos i förhållande till mortalitet) och den statistiska metod som används för analys av resultaten. Ett preliminärt test kan användas som stöd för valet av lämpliga doser.

Varje testkoncentration bör ges till minst tre likadana testgrupper med tio bin per grupp.

Utöver själva testserierna bör minst tre kontrollgrupper med tio bin per grupp också behandlas. Om ett organiskt lösningsmedel eller ett vätmedel används måste tre extra kontrollgrupper med tio bin per grupp användas för lösningsmedlet eller vätmedlet.

1.6.2 **Giftekvivalent**

En giftekvivalent måste tas med i testserien. Minst tre doser bör väljas på sådant sätt att de täcker det förväntade LD_{50}-värdet. Minst tre likadana burar med tio bin per bur bör användas för varje testdos. Som giftekvivalent rekommenderas dimetoat. vars LD_{50}-värde (kontakt) enligt rapporterade uppgifter ligger inom området 0,10–0,30 μg verksamt ämne per bi (2). Även andra giftekvivalenter kan godtas förutsatt att man har tillgång till tillräckliga data om förväntad dosrespons (t.ex. paration).

1.6.3 **Exponering**

1.6.3.1 *Tillförsel av doser*

De bedövade bina behandlas individuellt genom lokal applicering. Bina väljs slumpmässigt ut för de olika testdoserna och kontrollgrupperna. En volym på 1 μl lösning innehållande testämnet i lämplig koncentration appliceras med mikroapplikator på flanksidan på bröstkorgen av varje bi. Om det är motiverat kan andra volymer användas. Efter appliceringen fördelas bina i testburarna där de bör ha tillgång till sackaroslösning.

1.6.3.2 *Testperiodens längd*

Rekommenderad testperiod är 48 timmar. Om mortaliteten ökar med mer än 10 % när det har gått 24–48 timmar från appliceringen bör testperioden förlängas (till högst 96 timmar), förutsatt att kontrollgruppens mortalitet inte överskrider 10 %.

▼B

1.6.4 **Observationer**

Mortaliteten registreras vid 4 timmar efter doseringen och därefter vid 24 och 48 timmar. Om det behövs en längre testperiod görs efterföljande bedömningar med 24 timmars intervall (upp till högst 96 timmar), förutsatt att kontrollgruppens mortalitet inte överskrider 10 %.

Allt avvikande uppförande som observeras under testperioden bör registreras.

1.6.5 **Gränstest**

I vissa fall (t.ex. om ett testämne förväntas ha låg toxicitet) kan gränstest utföras med 100 µg verksamt ämne per bi, i syfte att demonstrera att LD_{50} är högre än detta värde. Förfarandet bör vara detsamma, inklusive tre likadana testgrupper för testdosen, relevanta kontrollgrupper och användning av giftekvivalent. Om det förekommer mortalitet bör ett fullständigt test genomföras. Alla eventuella observerade subletala verkningar bör registreras (se avsnitt 1.6.4).

2. **DATA OCH RAPPORTERING**

2.1 DATA

Alla uppgifter bör sammanställas i en tabell. Av tabellen ska framgå, för varje testgrupp samt för varje kontrollgrupp och varje giftekvivalentgrupp, antalet bin som använts, mortaliteten vid varje observationstidpunkt och antalet bin med ett beteende som tyder på skadliga verkningar. Mortalitetsdata bör analyseras med lämpliga statistiska metoder (t.ex. probit-analys, rörligt medelvärde eller binominal sannolikhet) (3), (4). Dos-responskurvor uppritas för varje rekommenderad observationstidpunkt (24, 48 och i förekommande fall 72 och 96 timmar) och kurvornas lutning och median letal dos (LD_{50}) beräknas med 95 % konfidensintervall. Korrigeringar för kontrollgruppens mortalitet kan göras med hjälp av Abbott-korrigering (4), (5). LD_{50}-värdet uttrycks som µg testämne per bi.

2.2 TESTRAPPORT

Testrapporten ska innehålla nedan angivna uppgifter.

2.2.1 **Testämne**

— Aggregationstillstånd och fysikalisk-kemiska egenskaper (t.ex. stabilitet i vatten, ångtryck).

— Kemiska identifieringsdata, inklusive strukturformel, renhet (för bekämpningsmedel t.ex. identiteten och halten av verksamt ämne eller verksamma ämnen).

2.2.2 **Försöksdjur**

— Vetenskapligt namn, ras, ungefärlig ålder (i veckor), insamlingsmetod, insamlingsdatum.

— Information om de samhällen som används for insamling av testbin, inklusive hälsa, eventuella vuxensjuk domar, eventuella förbehandlingar osv.

▼B

2.2.3 **Testförhållanden**

— Temperatur och relativ fuktighet i testrummet.

— Förvaringsförhållanden, inklusive burarnas typ, storlek och material.

— Metod för tillförsel av testamnet, t.ex. använt vehikellösningsmedel, tillförd volym testlösning och använd bedövning.

— Testets utformning, t.ex. antal doser och deras storlek, antalet kontrollgrupper, för varje testdos och kon trollgrupp även antalet likadana burar och antalet bin per bur.

— Testdatum.

2.2.4 **Resultat**

— Resultaten från preliminära test (i förekommande fall).

— Rådata: mortaliteten för varje koncentration som testats vid varje observationstidpunkt.

— Dos-responskurvorna vid testets slut.

— LD_{50}-värden med 95 % konfidensintervall, vid varje rekommenderad observationstidpunkt, för testämnet och för giftekvivalenten.

— Statistiska metoder som använts för att bestämma LD_{50}.

— Mortaliteten i kontrollgrupperna.

— Övriga biologiska verkningar som observerats eller uppmätts och all onormal respons från bina.

— Varje avvikelse från de testmetodförfaranden som beskrivs här samt all annan relevant information.

3. **HÄNVISNINGAR**

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, s. 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, s. 119–125.

3. Litchfield, J. T. and Wilcoxon, F. (1949), A simplified method of evaluating dose-effect experiments, Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, s. 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, s. 265–267.

▼B

C.18 BESTÄMNING AV ADSORPTION OCH DESORPTION I JORD VID JÄMVIKT I UPPSLAMMAT JORDPROV

1. METOD

Denna metod är i stort sett identisk med OECD TG 106 – Determination of Soil Adsorption/Desorption, using a Batch Equilibrium Method (2000).

1.1 INLEDNING

Metoden bygger bland annat på ett ringprov och en workshop för val av jordar för adsorptionstest (1) (2) (3) (4) samt existerande riktlinjer på nationell nivå (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11).

Adsorptions- och desorptionstest används för att erhålla grundläggande uppgifter om kemiska ämnens rörlighet och deras fördelning i biosfärens jord, vatten och luft (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21). Uppgifterna kan utnyttjas för att förutspå eller uppskatta t.ex. ett visst kemiskt ämnes tillgänglighet vid organismernas nedbrytningsprocesser (22) (23) samt, omvandlings- och upptagningsprocesser (24), ämnets urlakning genom jordprofilen (16) (18) (19) (21) (25) (26) (27) (28), ämnets flyktighet från jorden (21) (29) (30) eller ämnets avrinning från land och ytor in i naturliga vatten (18) (31) (32). Adsorptionsdata kan användas för jämförelser och för att skapa modeller (19) (33) (34) (35).

Ett kemiskt ämnes fördelning mellan jord- och vattenfas är en komplex process som beror på flera olika faktorer: ämnets kemiska natur (12) (36) (37) (38) (39) (40), jordfasens egenskaper (4) (12) (13) (14) (41) (42) (43) (44) (45) (46) (47) (48) (49) och klimatbetingade faktorer såsom regn, temperatur, sol och vind. Den mångfald fenomen och mekanismer som deltar i ämnets adsorption i jord kan därför inte beskrivas fullständigt med hjälp av den aktuella testmetoden, som utgör en förenklad laboratoriemodell. Även om detta test inte kan täcka alla tänkbara miljösituationer ger det ändå tillräckliga uppgifter om den betydelse för miljön som adsorptionen av det aktuella ämnet har.

Se även den allmänna inledningen.

1.2 TILLÄMPNINGSOMRÅDE

Syftet med metoden är att kunna uppskatta ett ämnes adsorptions- och desorptionsbeteende i jordar. Målet är att få ett sorptionsvärde som kan användas för att uppskatta fördelningen när miljöbetingelserna varierar. För detta ändamål bestäms ämnets adsorptionskoefficient i jämvikt i olika jordar som funktion av jordens egenskaper (t.ex. halten av organiskt kol och lera samt jordens textur och pH). Olika jordtyper måste användas för att testet i så hög grad som möjligt ska täcka växelverkan mellan ett ämne och naturligt förekommande jordarter.

Inom ramen för denna metod avser man med begreppet adsorption den process när ett ämne binds till en jordyta, utan att i detta sammanhang skilja mellan olika adsorptionsprocesser (fysikalisk eller kemisk adsorption) eller processer såsom ytkatalyserad nedbrytning, bulkadsorption eller kemisk reaktion. Adsorption, som sker på kolloidala partiklar (diameter < 0,2 um) som har bildats av jordarterna, räknas inte.

▼B

De viktigaste jordparametrarna med tanke på adsorptionen anses vara följande: halten av organiskt kol (3) (4) (12) (13) (14) (41) (43) (44) (45) (46) (47) (48), lerbaken och jordens textur (3) (4) (41) (42) (43) (44) (45) (46) (47) (48) samt joniserbara föreningars pH (3) (4) (42). Andra jordparametrar som kan ha inverkar på adsorption/desorption för ett särskilt ämne är den effektiva katjonbyteskapaciteten (ECEC), halten av amorft järn och aluminiumoxider, särskilt i fråga om vulkaniska och tropiska jordar (4), samt den specifika ytan (49).

Syftet med testet är att utvärdera ett ämnes adsorption i olika jordtyper för vilka halten av organiskt kol, 1er-halten och jordens textur och pH varierar. Testet omfattar tre skeden:

Skede 1: Förberedande undersökningar för att bestämma följande:

— Jord-lösningsförhållandet.

— Tiden för att nå adsorptionsjämvikt och mängden av adsorberat testämne vid jämvikt.

— Testamnets adsorption på testkärlens yta och testämnets stabilitet under testningstiden.

Skede 2: Screeningtest: undersökning av adsorptionen i fem olika jordtyper genom adsorptionskinetik vid en vald koncentration och bestämning av fordelningskoefficienterna K_d och K_{oc}.

Skede 3: Bestämning av Freundlich-adsorptionsisotermer för att fastställa hur koncentrationen inverkar på adsorptionens omfattning i jordar.

Undersökning av desorption genom desorptionskinetik och Freundlich-desorptionsisotermer (bilaga 1).

1.3 MATSTORHETER – DEFINITIONER OCH MATTENHETER

Beteckning	Definition	Måttenhet
A_{t_i}	procentuell adsorption vid tidpunkten t_i	%
A_{eq}	procentuell adsorption vid adsorptionsjämvikt	%
$m_s^{ads}(t_i)$	massan av testämne som adsorberats i jorden vid tidpunkten t_i	µg
$m_s^{ads}(\Delta t_i)$	massan av testämne som adsorberats i jorden under tidsintervallet Δt_i	µg
$m_s^{ads}(eq)$	massan av testämne som adsorberats i jorden vid adsorptionjämvikt	µg
m_0	massan av testämne i provröret vid adsorptionstestest början	µg
$m_m^{ads}(t_i)$	massan av testämne uppmät i ett delprov (v_a^A) vid tidpunkten t_i	µg
$m_{aq}^{ads}(eq)$	massan av testämne i lösningen vid adsorptionsjämvikt	µg
m_{jord}	mängd av jordfas, uttryckt som jordens torrmassa	g

▼B

Beteckning	Definition	Måttenhet
C_{st}	masskoncentrationen i ämnets stamlösning	µg cm^{-3}
C_0	ursprunglig masskoncentration i provlösningen som är i kontakt med jord	µg cm^{-3}
$C_{aq}^{ads}(t_i)$	ämnets masskoncentration i vattenfasen vid tidpunkten t_i då analysen utförs	µg cm^{-3}
$C_s^{ads}(eq)$	halten av ämne som adsorberats i jord vid adsorptionsjämvikt	µg g^{-1}
$C_{aq}^{ads}(eq)$	ämnets masskoncentration i vattenfasen vid adsorptionjämvikt	µg cm^{-3}
V_0	ursprunglig volym av vattenfas i kontakt med jord under adsorptionstestet	cm^3
v_a^A	volymen för det delprov som används för att mätta testämnet	cm^3
K_d	adsorptionens fördelningskoefficient	cm^3 g^{-1}
K_{oc}	normaliserad adsorptionskoefficient	cm^3 g^{-1}
K_{om}	normaliserad fördelningskoefficient	cm^3 g^{-1}
K_F^{ads}	Freundlich-adsorptionskoefficient	µg $^{1-1/n}$ (cm^3) $^{1/n}$ g^{-1}
1/n	Freundlich-exponent	
D_{t_i}	procentuell desorption vid tidpunkten t_i	%
$D_{\Delta t_i}$	procentuell desorption under intervallet Δt_i	%
K_{des}	skenbar desorptionskoefficient	cm^3 g^{-1}
K_F^{des}	Freundlich-desorptionskoefficient	µg $^{1-1/n}$ (cm^3) $^{1/n}$ g^{-1}
$m_{aq}^{des}(t_i)$	massan av testämne som desorberats från jord vid tidpunkten t_i	µg
$m_m^{des}(\Delta t_i)$	massan av testämne som desorberats från jord under tidsintervallet Δt_i	µg
$m_m^{des}(eq)$	analytiskt bestämd ämnesmassa i vattenfasen vid desorptionsjämvikt	µg
$m_{aq}^{des}(eq)$	totala massan av testämne som desorberats vid desorptionsjämvikt	µg
$m_s^{des}(\Delta t_i)$	massan av ämne som förblir adsorberat i jorden tidsintervallet Δt_i	µg
m_{aq}^A	massan av ämne som blivit över från adsorptionsjämvikten på grund av ofullständig volymersättning	µg
$C_s^{des}(eq)$	halten av testämne som förblir adsorberat i jorden vid desorptionsjämvikt	µg g^{-1}

▼B

Beteckning	Definition	Måttenhet
$C_{aq}^{des}(eq)$	testämnets masskoncentration i vattenfasen vid desorptionsjämvikt	µg cm^{-3}
V_T	totala volymen vattenfas i kontakt med jord under desorptionskinetiktest enligt seriemetoden	cm^3
V_R	volymen supernatant som har avlägsnats ur röret efter uppnådd adsorptionsjämvikt och som har ersatts med samma volym av 0,01 M $CaCl_2$-lösning	cm^3
v_a^D	volymen delprov som tagits för analytiskt syfte under ett desorptionskinetiktest enligt seriemetoden	cm^3
V_r^r	volymen lösning som tagits ur röret (i) för mättning av testämnet under desorptionskinetiktest (parallellmetod)	cm^3
V_r^F	volymen lösning som vid jämvikt tagits ur röret för mättning av testämnet	cm^3
MB	massbalans	%
m_E	totala massan av testämne som extraherats ur jorden och provkärlets väggar i två steg	µg
V_{rec}	volymen supernatant som insamlats efter uppnådd adsorptionsjämvikt	cm^3
P_{ow}	fördelningskoefficient för oktanol-vatten	
pKa	dissociationkoefficient	
S_w	vattenlöslighet	g l^{-1}

1.4 PRINCIPEN FOR TESTMETODEN

Kända volymer av testämneslösning, omärkta eller radioaktivt märkta och med kända koncentrationer i 0,01 M $CaCl_2$ blandas med jordprover av känd torrvikt som har bringats till jämvikt i 0,01 M $CaCl_2$. Blandningen rörs om tillräckligt länge. Jordsuspensionerna separeras därefter genom centrifugering, och om så önskas kan filtratet och vattenfasen analyseras. Mängden av testämne som adsorberats i jordprovet bestäms som skillnaden mellan den ursprungliga mängden av testämne i lösningen och mängden av kvarvarande testämne i slutet av testet (indirekt metod).

Alternativt kan mängden av adsorberat testämne bestämmas direkt genom jordanalys (direkt metod). Denna procedur, som inbegriper stegvis jordextraktion med lämpligt lösningsmedel, rekommenderas i fall dar skillnaden i lösningens halt av testämne inte kan bestämmas med tillräcklig noggrannhet. Detta kan förekomma om testämnet adsorberas pä provkärlens yta, om testämnet är instabilt inom den tidsskala testet sträcker sig över, om adsorptionen är så svag att halten bara ändras lite eller om adsorptionen är så stark att den resulterande halten ar for låg för att kunna bestämmas med tillräcklig noggrannhet. Om radioaktivt märkt ämne används kan man undvika jordextraktion genom att analysera jordfasen med förbränning och vätskescintillationsräknare (LSC). LSC är dock en icke-specifik teknik som inte kan skilja mellan ursprungliga ämnen och omvandlingsprodukter och som därför bara kan användas om testämnet är stabilt under hela testet.

▼B

1.5 UPPGIFTER OM TESTÄMNET

De kemiska reagenser som används ska ha hög analytisk renhetsgrad. Rekommenderade testämnen är omärkta ämnen med känd sammansättning och en renhetsgrad på helst minst 95 % eller radioaktivt märkta ämnen med känd sammansättning och radioaktiv renhet. Om spårämnen med kort halveringstid används ska sönderfallskorrigering tillämpas.

Innan adsorptions- och desorptionstestet utförs ska följande uppgifter finnas om testämnet:

a) vattenlöslighet (A.6)

b) ångtryck (A.4) eller Henrys lag-koefficient

c) abiotisk nedbrytning: hydrolys som funktion av pH (C.7)

d) fördelningskoefficient (A.8)

e) ”lätt” biologisk nedbrytbarhet (C.4) eller aerobisk och anaerobisk omvandling i jord

f) pKa för joniserbara ämnen

g) direkt fotolys i vatten (t.ex. UV-Vis-absorptionsspektrum i vatten och kvantutbyte) och fotonedbrytning i jord.

1.6 TESTETS TILLÄMPBARHET

Testet kan tillämpas på kemiska ämnen som kan analyseras med tillräcklig noggrannhet. En viktig parameter som kan påverka tillförlitligheten hos resultaten, särskilt när den indirekta metoden används, är testämnets stabilitet inom testets tidsskala. Ämnets stabilitet måste därför kontrolleras med en förhandsundersökning, och om den visar att det förekommer omvandling inom testets tidsskala är det tillrådligt att huvudundersökningen utförs med analys av både jord- och vattenfasen.

Det kan vara svårt att genomföra testet med ämnen som har låg vattenlöslighet (S_w, $< 10^{-4}$ g l^{-1}) eller med ämnen som har hög elektrisk laddning, eftersom koncentrationen i vattenfasen då inte kan analyseras med tillräcklig noggrannhet. För sådana ämnen krävs vissa extra åtgärder. Närmare anvisningar finns i berörda avsnitt.

Vid testning av flyktiga ämnen är det viktigt att se till att det inte uppstår hanteringsförluster.

1.7 METODBESKRIVNING

1.7.1 **Apparatur och kemiska reagenser**

Normal laboratorieutrustning, särskilt följande:

a) Provrör eller andra kärl för testet. Det är viktigt att rören eller kärlen

— passar direkt in i centrifugen så att hanterings- och överföringsfel kan undvikas,

— är gjorda av ett inert material så att adsorption av testämnet på rörets eller kärlets yta minimeras.

▼B

b) Skakapparat: rotationsskak eller motsvarande, i ett utförande där jorden hålls i suspension under omrö ringen.

c) Centrifug: helst i höghastighetsutförande, t.ex. med centrifugalkraft > 3 000 g, temperaturkontrollerad och med kapacitet att från vattenlösning separera partiklar med diameter större än 0,2 μm. Under omröring och centrifugering ska behållarna vara täckta med lock så att flyktighets- och vattenförluster kan undvi kas. För att minimera adsorption på locken ska dessa vara deaktiverade, t.ex. teflonbelagda skruvkorkar.

d) Gärna även: filtreringsapparat som har sterila engångsfilter med porositeten 0,2 μm. Särskild vikt ska fäs tas vid valet av filtermaterial så att förluster av testämne på filtret kan undvikas. För svårlösliga testämnen avråds användning av organiska filtermaterial.

e) Analysinstrument lämpliga för mätning av testämnets koncentration.

f) Laboratorieugn som kan hålla en temperatur mellan 103 °C och 110 °C.

1.7.2 **Karakterisering av jordar och urval av jordar för test**

Jordarna karakteriseras med hjälp av tre parametrar som anses vara i hög grad avgörande för adsorptionskapaciteten: organiskt kol, lerbak och jordens textur samt pH. Såsom tidigare nämnts (se avsnittet Tillämpningsområde) kan även andra fysikalisk-kemiska egenskaper hos jorden påverka adsorption och desorption av ett visst ämne, och de ska i så fall beaktas.

Valet av metoder för jordkarakteriseringen är av stor vikt och kan ha betydande inverkan på resultaten. Det rekommenderas därför att jordens pH mäts i en lösning av 0,01 M $CaCl_2$ (dvs. den lösning som används vid adsorptions- och desorptionstestet) enligt gällande ISO-metod (ISO-10390-1). Det rekommenderas också att övriga jordegenskaper av betydelse bestäms enligt standardmetoder (ISO Handbook of soil analysis) så att sorptionsdata kan analyseras på basis av globalt standardiserade jordparametrar. Arbetena (50–52) innehåller viss vägledning om existerande standardmetoder för jordanalys och jordkarakterisering. Det är tillrådligt att använda referensjordar för kalibrering av jordtestmetoderna.

Tabell 1 innehåller anvisningar för valet av jordar för adsorptions- och desorptionstest. De sju utvalda jordarna spänner över jordtyper som finns i tempererade geografiska zoner. För joniserbara testämnen ska de utvalda jordarna sträcka sig över ett stort pH-område så att ämnets adsorption kan bestämmas i joniserad och ojoniserad form. Anvisningar för hur många olika jordar som ska användas i de olika teststegen finns i avsnitt 1.9 (Mätförfarande).

Om andra jordtyper väljs ska de karakteriseras med användning av samma parametrar och ska ha liknande variationer i fråga om de egenskaper som beskrivs i tabell 1, även om de inte behöver motsvara kriterierna fullständigt exakt.

▼B

Tabell 1

Anvisningar för val av jordprover för adsorption och desorption

Jordtyp	pH-område (i 0,01 M $CaCl_2$)	Halt av organiskt kol (%)	Lerhalt (%)	Jordtextur ([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]) Enligt FAO och det amerikanska systemet (85).
([2]) Variablerna ska helst ha värden inom de angivna intervallen. Om det är svårt att hitta lämpligt jordmaterial kan värden under det angivna minimivärdet godtas.
([3]) Jordar med mindre an 0,3 % organiskt kol kan störa korrelationen mellan halten av organiskt material och adsorption. Det är därför tillrådligt att använda jordar med en minimihalt av 0,3 % organiskt kol.

1.7.3 **Provtagning och förvaring av jordprover**

1.7.3.1 *Provtagning*

Det finns inga särskilda rekommendationer om specifika metoder eller verktyg för provtagning. Provtagningsmetoden beror på undersökningens syfte (53) (54) (55) (56) (57) (58).

Följande aspekter ska beaktas:

a) Platsen ska beskrivas i detalj, bl.a. genom läge, vegetationstäcke, behandlingar med bekämpnings- och gödningsmedel, biologiska tillsatser eller oavsiktlig förorening. Beskrivningen av provtagningsplatsen ska följa rekommendationerna i ISO-standarden för tagning av jordprover (ISO 10381-6).

b) Provtagningsplatsen ska anges med UTM-koordinater (Universal Transversal Mercator-Projection/European Horizontal Datum) eller geografiska koordinater. På så sätt kan man längre fram ta nya prover av viss jord. Det kan också underlätta bestämningen av jorden enligt de olika ländernas klassificeringssystem. Vidare ska endast A-horisont tas, ned till ett maximidjup på 20 cm. För jord 7 gäller särskilt att om det finns O_h-horisont närvarande i jorden ska denna horisont tas med i provet.

]ordproverna ska transporteras i behållare, och temperaturbetingelserna ska vara sådana att jordprovernas ursprungliga egenskaper inte förändras i någon signifikant grad.

▼B

1.7.3.2 *Förvaring*

Jordproverna ska helst användas färska. Om detta inte är möjligt ska jorden förvaras lufttorkad i omgivningstemperatur. Det finns inga rekommenderade gränser för förvaringstiden, men om ett jordprov är äldre än tre år måste det analyseras pä nytt avseende halten av organiskt kol, pH och CEC.

1.7.3.3 *Hantering och beredning av jordprover för test*

Jordproverna lufttorkas vid omgivningstemperatur (helst 20–25 ^{o}C). Finfördelningen ska göras så varsamt som möjligt för att minimera ändringarna i jordens ursprungliga textur. Jordarna sållas till en partikelstorlek < 2 mm med beaktande av rekommendationerna i ISO-standarden om tagning av jordprover (ISO 10381-6). Omsorgsfull homogenisering rekommenderas eftersom resultatens reproducerbarhet då förbättras. Fukthalten i varje jordprov bestäms i tre delprover genom torkning vid 105 ^{o}C tills ingen signifikant viktändring längre kan registreras (cirka 12 timmar). Vid alla beräkningar som omfattar jordmassa avses ugnstorkad massa, dvs. jordens vikt korrigerad med en fukthaltsfaktor.

1.7.4 **Beredning av testämnet före kontakten med jord**

Testämnet upplöses i en lösning av 0,01 M $CaCl_2$ i destillerat eller avjoniserat vatten. $CaCl_2$-lösningen används som vattenlösningsfas för att förbättra centrifugeringen och minimera katjonbytet. Stamlösningens koncentration ska helst vara tre tiopotenser högre an analysmetodens detektionsgräns. Genom denna tröskel säkerställs tillräcklig mätnoggrannhet med den använda metoden. Dessutom ska stamlösningens koncentration vara lägre än testämnets vattenlöslighet.

Stamlösningen ska helst beredas strax före kontakten med jordproverna och förvaras i stängd behållare vid 4 ^{o}C. Förvaringstiden beror på testämnets stabilitet och dess koncentration i lösningen.

Hjälplösningsmedel för upplösning av testämnet ska bara användas om ämnet är svårlösligt ($S_w < 10^{-4}$ g t^{-1}). Hjälplösningsmedlet ska a) vara blandbart med vatten, t.ex. metanol eller acetonitril, ska b) ha en koncentration som inte överskrider 1 % av stamlösningens totalvolym och en koncentration som är under 1 % i den testämneslösning som kommer i kontakt med jorden (helst under 0,1 %) och får c) inte vara ett ytaktivt ämne eller genomgå solvolytiska reaktioner med testamnet. Användningen av ett hjälplösningsmedel måste vara föreskriven och ska motiveras i rapporten.

Ett annat alternativ för att tillföra ett svårlösligt testämne i testsystemet är att använda tillsats (spiking). Det innebär att testämnet upplöses i ett organiskt lösningsmedel, och ett delprov av denna lösning tillsatts systemet bestående av jord och 0,01 M $CaCl_2$-lösning i destillerat eller avjoniserat vatten. Halten av organiskt lösningsmedel i vattenfasen ska hällas så låg som möjligt, normalt ska den inte överskrida 0,1 %. Tillsats från en organisk lösning kan innebära att reproducerbarheten går förlorad i fråga om volymen, dvs. ett nytt fel kan komma in eftersom testämnets och hjälplösningsmedlets koncentration inte är samma i alla test.

▼B

1.8 FÖRUTSÄTTNINGAR FÖR UTFÖRANDE AV ADSORPTIONS- OCH DESORPT1ONSTEST

1.8.1 **Analysmetod**

Följande nyckelparametrar kan påverka sorptionsmätningarnas noggrannhet: noggrannheten hos den metod som används för att analysera lösningen och de adsorberade faserna, testämnets stabilitet och renhet, uppnåendet av sorptionsjämvikt, storleksordningen på lösningens koncentrationsändring, förhållandet mellan jord och lösning samt ändringar i jordens struktur under jämviktsprocessen (35) (59–62). Noggrannheten tas upp i några av exemplen i tillägg 2.

Analysmetodens tillförlitlighet måste kontrolleras inom testets sannolika koncentrationsområde. Det står laboratoriet fritt att utveckla en lämplig metod med lämpliga värden i fråga om noggrannhet, reproducerbarhet, detektionsgränser och utbyte. Anvisningar för hur ett sådant test kan utföras ges nedan.

En lämplig volym av 0,01 M $CaCl_2$ (t.ex. 100 cm^2 rörs om under 4 timmar med en viktmängd (t.ex. 20 g) jord som har hög adsorptionsförmåga, dvs. hög halt av organiskt kol och lera. Dessa vikter och volymer kan variera beroende på analysbehoven, men ett jord-lösningsförhållande på 1:5 är en lämplig utgångspunkt. Blandningen centrifugeras och vattenfasen kan filtreras. En bestämd volym av testämnets stamlösning tillsätts till vattenfasen så att den nominella koncentrationen kommer inom testets sannolika koncentrationsområde. Volymen ska vara högst 10 % av vattenfasens slutliga volym, så att karaktären hos den jämviktade jordlösningen ändras så lite som möjligt. Lösningen analyseras.

Ett blindprov bestående av systemet jord + $CaCl_2$-lösning (utan testämne) måste ingå, för kontroll av falska indikationer i analysmetoden och matriseffekter orsakade av jorden.

Bland de analysmetoder som kan användas för sorptionsmätningar ingår gas-vätskekromatografi (GLC), högtrycksvätskekromatografi (HPLC), spektrometri (t.ex. GC-masspektrometri och HPLC-masspektrometri) och vätskescintillationsräknare (för radioaktivt märkta ämnen). Oavsett vilken metod som används gäller kriteriet att metoden anses lämplig om utbytet är mellan 90 % och 110 % av det nominella värdet. För att möjliggöra detektion och utvärdering efter det att ämnet fördelats måste analysmetodens detektionsgränser vara minst två tiopotenser under den nominella koncentrationen.

Egenskaper och detektionsgränser hos den analysmetod som används vid adsorptionstest spelar en viktig roll när det gäller att definiera testbetingelserna och testets totala provningsprestanda. Den föreliggande metoden följer ett allmänt testförlopp och innehåller rekommendationer och anvisningar för alternativa tillvägagångssätt i fall där analysmetoden och laboratoriets betingelser kan medföra begränsningar.

▼B

1.8.2 **Val av optimalt förhållande mellan jord och lösning**

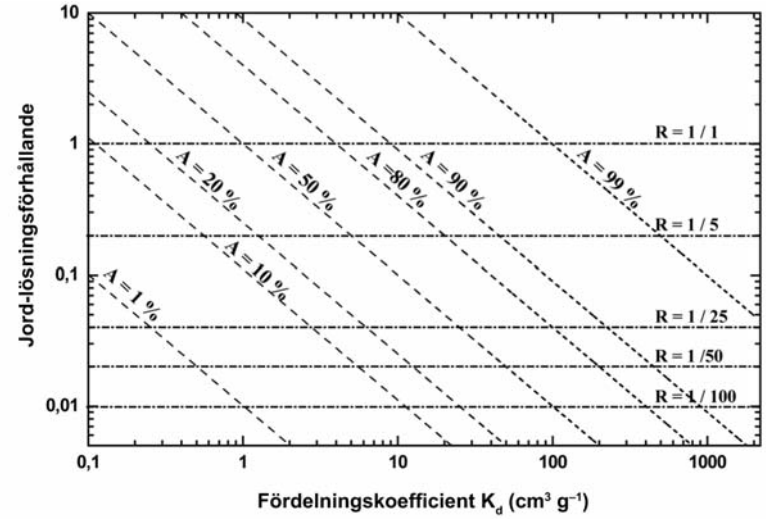
Valet av lämpligt jord-lösningsförhållande för sorptionsundersökningar är beroende av fördelningskoefficienten K_d och den önskade relativa adsorptionsgraden. Ämnets koncentrationsändring i lösningen avgör mätningens statistiska noggrannhet – grundat på adsorptionsekvationens form och analysmetodens gränser – vid detektion av ämnets koncentration i lösningen. För vanligt bruk är det därför praktiskt att bestämma sig för en uppsättning konstanta standardförhållanden för vilka adsorptionen är över 20 %, och helst över 50 % (62), samtidigt som man ska se till att testämnets koncentration i vattenfasen hålls så pass hög så att den kan mätas med tillräcklig noggrannhet. Detta är särskilt viktigt när adsorptionsprocenterna är höga.

Ett lämpligt tillvägagångssätt för att välja lämpliga jord-lösningsförhållanden grundar sig på estimering av K_d-värdet, antingen genom förberedande undersökningar eller genom vedertagna estimeringsmetoder (tillägg 3). Valet av lämpligt förhållande kan sedan göras med hjälp av ett diagram där jord-lösningsförhållandet har avsatts mot K_d för konstanta adsorptionsprocenter (figur 1). Härvid antas att adsorptionsekvationen är linjär ([1]). Det sökta sambandet erhålls genom att bilda om ekvation 4 för K_d så att den får formen enligt ekvation 1:

$$\frac{V_0}{m_{soil}} = \left(\frac{m_0}{m_s^{ads}(eq)} - 1\right) K_d \qquad (1)$$

eller logaritmisk form med antagande av att $R = m_{soil}/V_0$ and $A_{eq}\ \%/100 = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_0}$:

$$\log R = -\log K_d + \log\left[\frac{(A_{eq}\%/100)}{(1 - A_{eq\%/100})}\right] \qquad (2)$$



Figur 1 Sambandet mellan jord-lösningsförhållande och K_d vid olika procenthalter av adsorberat testämne

([1]) $C_s^{ads}(eq) = K_d \cdot C_{aq}^{ads}(eq)$.

▼B

I figur 1 visas jord-lösningsförhållandet som funktion av K_d för olika adsorptionsnivåer. Exempel: För jord-lösningsförhållandet 1:5 och K_d = 20 blir adsorptionen cirka 80 %. För att få en adsorption på 50 % med samma K_d måste förhållandet 1:25 användas. Detta sätt att välja jord-lösningsförhållande ger möjlighet att anpassa till olika testningsbehov.

Däremot är det svårare att hantera områden där ämnet adsorberas väldigt mycket eller väldigt litet. Vid låg adsorption rekommenderas jord-lösningsförhållandet 1:1, men för vissa mycket organiska jordtyper kan ännu lägre förhållanden behövas för att erhålla slurry. Analysmetoden måste ägnas stor uppmärksamhet när det gäller matning av små ändringar i lösningens koncentration, annars blir adsorptionsmätningen inexakt. Å andra sidan kan man vid mycket höga värden på fördelningskoefficienten K_d gå upp till ett jord-lösningsförhållande på 1:100 för att lämna en signifikant mängd av ämnet i lösningen. Då är det viktigt med god omröring och att systemet får tillräcklig tid på sig för att uppnå jämvikt. Ett alternativt sätt är att uppskatta K_d-värdet med hjälp av estimeringsmetoder som t.ex. grundar sig på P_{ow}-värden (tillägg 3). Detta kan vara särskilt användbart för lågadsorberande och polära ämnen med $P_{ow} < 20$ och för lipofila och starkt sorptiva ämnen med $P_{ow} > 10^4$.

1.9 MÄTFÖRFARANDE

1.9.1 Testbetingelser

Alla test ska göras i omgivningstemperatur och om möjligt vid en konstant temperatur mellan 20 °C och 25 °C.

Centrifugeringsbetingelserna ska vara sådana att partiklar större än 0,2 μm kan avlägsnas från lösningen. Detta värde anger den minsta partikelstorleken för fasta partiklar och bildar gränsen mellan fasta och kolloidala partiklar. Anvisningar om lämpliga centrifugeringsbetingelser finns i bilaga 4.

Om det inte går att säkerställa att partiklar större an 0,2 um avlägsnas vid centrifugeringen, kan en kombination av centritugering och filtrering med 0,2 μm filter användas. Filtermaterialet ska vara inert så att det inte uppstår förluster av testamnet pä filtret. Under alla omständigheter måste det dokumenteras så att det inte uppstår förluster av testämnet under filtreringen.

1.9.2 **Skede 1 – Förberedande undersökning**

Syftet med den förberedande undersökningen beskrivs i avsnittet Tillämpningsområde. Anvisningar för hur en sådan förberedande undersökning kan läggas upp ges nedan.

1.9.2.1 *Val av optimala jord-lösningsförhållanden*

Två jordtyper och tre jord-lösningsförhållanden används (för sex tester). En av jordtyperna har hög halt av organiskt kol och låg lerhalt, och den andra typen har låg halt avorganiskt kol och hög lerhalt. Följande förhållanden föreslås:

— 50 g jord och 50 cm^3 vattenlösning av testämnet (förhållande 1:1),

▼B

— 10 g jord och 50 cm^3 vattenlösning av testämnet (förhållande 1:5),

— 2 g jord och 50 cm^3 vattenlösning av testämnet (förhållande 1:25).

Den minsta mängd jord som behövs för testet beror på laboratoriets utrustning och analysmetodernas prestanda. För tillförlitliga testresultat rekommenderas dock minst 1 g, helst 2 g.

Ett kontrollprov med enbart testämnet i 0,01 M $CaCl_2$-lösning (ingen jord) testas enligt exakt samma procedur som används för testsystemet, för att kontrollera testämnets stabilitet i $CaCl_2$-lösningen och dess eventuella adsorption på testkärlets ytor.

Ett blindprov per jord, med samma mängd jord och en totalvolym på 50 cm^3 0,01 M $CaCl_2$-lösning (utan testämne) testas på samma sätt. Detta blindtest fungerar som bakgrundskontroll under analysen så att man kan detektera störande ämnen eller förorenade jordar.

Alla test, även kontroll- och blindtest, ska utföras minst två gånger. Det totala antalet prover som ska beredas för undersökningen bestäms utifrån den metod som används.

Metoderna för den förberedande undersökningen och huvudundersökningen är i regel desamma. I förekommande fall nämns skillnader som är av betydelse.

De lufttorkade jordproverna bringas till jämvikt genom omröring med en minimivolym på 45 cm^3 0,01 M $CaCl_2$ över natten (12 timmar) dagen före testet. Därefter tillsätts en bestämd volym av testämnets stamlösning för att justera den slutliga volymen till 50 cm^3. Den tillsatta mängden av stamlösning ska a) vara högst 10 % av vattenfasens slutliga volym på 50 cm^3 för att minimera ändringen av karaktären hos den jämviktade jordlösningen och b) helst ge en ursprunglig koncentration av testämnet som är i kontakt med jorden (C_0) som är minst två tiopotenser högre än analysmetodens detektionsgräns. Med denna tröskel säkerställs möjligheten att utföra tillräckligt noggranna mätningar även när stark adsorption inträffar (> 90 %) och möjligheten att längre fram bestämma adsorptionsisotermerna. Helst ska också, om det är möjligt, ämnets ursprungliga koncentration (C_0) inte överskrida hälften av dess löslighetsgräns.

Nedan ges ett exempel på beräkning av stamlösningens koncentration (C_M). För beräkningen gäller antagandet att detektionsgränsen är 0,01 µg cm^{-3} och adsorptionen 90 %. Sålunda ska den ursprungliga koncentrationen av testämne i kontakt med jorden helst vara lug cm^3 (två tiopotenser högre än detektionsgränsen). Under antagandet att den maximala rekommenderade volymen stamlösning tillsätts, dvs. 5 cm^3 till 45 cm^3 0,01 M $CaCl_2$-jämviktslösning (= 10 % stamlösning till 50 cm^3 total volym av vattenfas), bör stamlösningens koncentration vara 10 µg cm^3, dvs. tre tiopotenser högre än analysmetodens detektionsgräns.

Vattenfasens pH ska mätas före och efter kontakt med jorden eftersom pH-värdet spelar en viktig roll för hela adsorptionsprocessen, särskilt när det gäller joniserbara ämnen.

▼B

Lösningen rörs om så länge att adsorptionsjämvikt uppnås. Tiden för att nå jämvikt varierar kraftigt beroende pä ämnet och jorden. I regel räcker 24 timmar (77). Vid den förberedande undersökningen kan sekventiella prover tas under en omröringstid på 48 timmar, t.ex. vid 4, 8, 24 och 48 timmar, men analystidpunkterna kan också anpassas till arbetsschemat på laboratoriet.

Det finns två alternativ för analys av testämnet i vattenlösningen: a) parallellmetoden och b) seriemetoden. Det måste betonas att parallellmetoden, även om den tar längre tid att utföra, innebär enklare matematisk behandling av resultaten (tillägg 5). Valet av metod måste avgöras utifrån laboratoriets tillgängliga utrustning och resurser.

a) Parallellmetoden: Prover med samma jord-lösningsförhållande bereds. Antalet prover bestäms av antalet tidsintervall som används för undersökning av adsorptionskinetiken. Efter centrifugering och i förekommande fall filtrering tas det första rörets vattenfas till vara så fullständigt som möjligt och mäts efter t.ex. 4 timmar, det andra rörets vattenfas mäts efter 8 timmar, det tredje rörets efter 24 timmar osv.

b) Seriemetoden: Endast två likadana prover bereds för varje jord-lösningsförhållande. Faserna separeras genom centrifugering med bestämda tidsintervall. Ett litet delprov av vattenfasen analyseras omedelbart med avseende på testämnet, och därefter fortsätts testet med den ursprungliga blandningen. Om filtrering utförs efter centrifugeringen bör laboratoriet ha lämplig utrustning för filtrering av små delprover av vattenlösning. Det rekommenderas att den totala volymen delprover som tas inte överskrider 1 % av lösningens totalvolym, så att det inte uppstår signifikanta ändringar i jord-lösningsförhållandet och minskningar i den mängd av löst ämne som är tillgänglig för adsorption under testet.

Den procentuella adsorptionen A_{t_i} beräknas för varje tidpunkt (t_i) på grundval av den nominella ursprungskoncentrationen och den uppmätta koncentrationen vid tidpunkten för provtagningen (A_{t_i}), med korrigering för blindprovets värde. En kurva där avsätts mot tiden (figur 1 i tillägg 5) ritas upp för uppskattning av jämviktsplatån ([1]). Likaså beräknas K_d-värdet vid jämvikt. Utifrån detta K_d-värde väljs lämpliga jord-lösningsförhållanden i figur 1 så att den procentuella adsorptionen hamnar över 20 %, och helst över 50 % (61). De tillämpliga ekvationerna och principerna för uppritningen av kurvan ges i avsnittet ”Data och rapportering” och i bilaga 5.

1.9.2.2 *Bestämning av adsorptionens jämviktstid och mängden av testämne som adsorberats vid jämvikt*

Kurvor där A_{t_i} ellerhar C_{aq}^{ads} avsatts mot tiden används, såsom tidigare nämnts, för att uppskatta när adsorptionsjämvikt inträtt och vilken mängd av testämne som adsorbcrats vid jämvikt. 1 figur 1 och 2 i tillägg 5 finns exempel på sådana kurvor. Jämviktstiden är den tid som systemet behöver för att nå en platå.

([1]) Jämviktsplatån kan också uppskattas genom att i ett diagram avsätta testämnets koncentration i vattenfasen ((C_{aq}^{ads}))mot tiden (se figur 2 i bilaga 5).

▼B

Om en viss jord inte ger upphov till någon platå utan en oavbruten ökning, kan detta bero på komplicerande faktorer såsom biologisk nedbrytning eller långsam diffusion. Biologisk nedbrytning kan konstateras genom att man upprepar testet med ett steriliserat prov av jorden. Om man fortfarande inte uppnår någon platå är det skäl att forska efter andra tänkbara faktorer. Detta kan göras med lämpliga ändringar av testbetingelserna (temperatur, omröringstider, jord-lösningsförhållande etc.). Testledaren får avgöra om det är värt att fortsätta testet även om jämvikt inte kan uppnås.

1.9.2.3 *Adsorption på testkärlets yta och testämnets stabilitet*

Vissa indikationer rörande testämnets adsorption på testkärlets yta och rörande testämnets stabilitet kan fås fram genom analys av kontrollproverna. Om en minskning som är större än analysmetodens standardfel konstateras kan detta bero på abiotiskt sönderfall och/eller adsorption på testkärlets yta. För att avgöra vilket fenomen som är aktuellt tvättas testkärlets grundligt med en känd volym av lämpligt lösningsmedel, varefter tvättlösningen analyseras med avseende på testämnet. Om analysen visar att ingen adsorption på testkärlets yta har skett, beror minskningen på att testämnet är abiotiskt instabilt. Om adsorption kan konstateras, är det nödvändigt att byta till testkärl av annat material. Dessa resultat gällande adsorption på testkärlets yta kan dock inte direkt extrapoleras till testet med jord och lösning, eftersom adsorptionen i det senare fallet påverkas av att jord ar närvarande.

Ytterligare uppgifter om testämnets stabilitet kan fas fram genom att man gör upp en massbalans som funktion av tiden. Detta görs genom att vattenfasen, extrakt av jord samt testkärlets väggar analyseras med avseende pä testamnet. Skillnaden mellan massan av tillsatt ämne och summan av testämnesmassorna i vattenfasen, i jordextrakten och på testkärlets väggar är lika med den massa som brutits ned eller förflyktigats eller som inte har extraherats. En förutsättning för att massbalansen ska kunna bestämmas är att adsorptionsjämvikt uppnås inom den tid som går åt för testet.

Massbalansen bestäms för båda jordarna och för ett jord-lösningsförhällande för respektive jord som vid jämvikt ger en adsorption på över 20 %, och helst över 50 %. När proceduren för att få fram lämpliga jord-lösningsförhållanden har avslutats med analysen av det sista provet av vattenfas efter 48 timmar, separeras faserna genom centrifugering och, om så önskas, filtrering. Så mycket vattenfas som möjligt tas tillvara, och ett lämpligt extraktionslösningsmedel (med extraktionskoefficient på minst 95 %) tillsätts jorden för att testämnet ska extraheras. Minst två extraktioner i följd rekommenderas. Mängden av testämne i extrakten från jord och testkärl bestäms, och massbalansen beräknas (se ekvation 10, Data och rapportering). Om massbalansen är under 90 % anses testämnet vara instabilt inom testets tidsskala. Undersökningarna kan emellertid fortsättas om man tar testämnets instabilitet med i beräkningen, och i sådana fall är det tillrådligt att vid huvudundersökningen analysera båda faserna.

▼B

1.9.3 *Skede 2 – Adsorptionskinetik vid en given koncentration av testämnet*

Fem jordar väljs enligt tabell 1. Det är till fördel om dessa fem jordar inbegriper en del eller alla av de jordar som använts för den förberedande undersökningen. Då behöver skede 2 inte upprepas för den förberedande undersökningens jordar.

Jämviktstiden, jord-lösningsförhållandet, jordprovets vikt, volymen av vattenfasen i kontakt med jord samt testämnets koncentration i lösningen väljs på grundval av resultaten från den förberedande undersökningen. Analys ska helst utföras efter en kontakttid på 2, 4, 6, 8 (eventuellt även 10) och 24 timmar. Omröringstiden kan vid behov förlängas till högst 48 timmar om ämnet kräver längre jämviktstid. Vid behov kan analystidpunkterna anpassas.

Varje test (en jord och en lösning) görs minst två gånger för att man ska få en indikation på resultatens varians. För varje test görs också ett blindtest. Det görs på jord och 0,01 M $CaCl_2$-lösning utan testämne och med samma vikt och volym som vid det riktiga testet. Som kontroll görs samma testprocedur på ett kontrollprov med enbart testämnet i 0,01 M $CaCl_2$-lösning (utan jord) som ett sätt att skydda sig mot oförutsedda faktorer.

Den procentuella adsorptionen beräknas för varje tidpunkt A_{t_i} eller tidsintervall $A_{\Delta t_i}$ (efter behov) och avsätts mot tiden i ett diagram. Likaså beräknas fördelningskoefficienten K_d vid jämvikt samt den normaliserade adsorptionskoefficienten K_{oc} (för opolära organiska ämnen).

Resultat av adsorptionskinetiktest

Det linjära K_d-värdet duger i allmänhet till att med tillräcklig noggrannhet beskriva sorptionsbeteendet i jord (35) (78), och det representerar ett uttryck för ämnenas inherenta rörlighet i jord. Som exempel kan nämnas att allmänt förekommande kemiska ämnen med $K_d \leq 1$ cm^3 g^{-1} i regel anses vara kvalitativt rörliga. Ett system för rörlighetsklassificering enligt K_{oc}-värden har konstruerats av MacCall et al. (16). Det finns också system för urlakningsklassificering som bygger på ett samband mellan K_{oc} och DT-50 ([1]) (32) (79).

Enligt felanalyser (61) kan K_d-värden under 0,3 cm^3 g^{-1} inte uppskattas med tillräcklig noggrannhet på grundval av en koncentrationsminskning i vattenfasen, inte ens när det (ur noggrannhetssynpunkt) gynnsammaste jordlösningsförhållandet används, dvs. 1:1. 1 detta fall rekommenderas analys av både jord- och lösningsfasen.

([1]) DT-50: nedbrytningstiden för 50 % av testämnet.

▼B

Med hänvisning till ovannämnda anmärkningar är det tillrådligt att undersökningen av ämnets adsorptionsbeteende i jord och dess potentiella rörlighet fortsätts genom bestämning av Freundlich-adsorptionsisotermer för sådana system där en tillräckligt noggrann bestämning av K_d är möjlig enligt schemat för den föreliggande testmetoden. En noggrann bestämning är möjlig om det värde som fås fram genom att multiplicera K_d med jordlösningsförhållandet är > 0,3 när mätningarna grundar sig på en koncentrationsminskning i vattenfasen (indirekt metod), eller > 0,1 när båda faserna analyseras (direkt metod) (61).

1.9.4 *Skede 3 – Adsorptionsisotermer, desorptionskinetik och desorptionsisotermer*

1.9.4.1 Adsorptionsisotermer

Fem testämneskoncentrationer används, helst så att de sträcker sig över två tiopotenser. Vid valet av koncentrationer ska vattenlösligheten och de resulterande jämviktskoncentrationerna i vattenlösning tas med i beräkningen, jordarnas respektive jord-lösningsförhållanden ska hållas konstanta genom hela undersökningen. Adsorptionstestet utförs enligt beskrivningen ovan, med enda skillnaden att vattenfasen bara analyseras en gång. efter den tid som enligt skede 2 går åt för att uppnå jämvikt. Jämviktskoncentrationerna i lösningen bestäms, och den adsorberade mängden beräknas på grundval av minskningen av testämne i lösningen, eller med hjälp av den direkta metoden. Den adsorberade massan per enhet jordmassa avsätts mot testämnets jämviktskoncentration i ett diagram (se Data och rapportering).

Resultat av adsorptionsisotermtest

Av alla hittills framlagda matematiska adsorptionsmodeller är Freundlich-isotermerna en av de mest använda när det gäller att beskriva adsorptionsprocesser. För närmare uppgifter om hur man tolkar adsorptionsmodeller och om deras betydelse hänvisas till arbetena (41) (45) (80) (81) (82).

Anmärkning: Det bör nämnas att jämförelse av K^-värden (Freundlich-adsorptionskocfficienter) för olika ämnen bara är möjlig om K, -värdena är uttryckta i samma måttenhet (83).

1.9.4.2 Desorptionskinetik

Syftet med detta test är att undersöka om ett ämne adsorberas reversibelt eller irreversibelt i en jord. Denna upplysning är betydelsefull eftersom desorptionsprocessen också spelar en viktig roll för hur ett ämne beter sig i fältjord. Dessutom är desorptionsdata värdefulla som indata när man vill skapa datormodeller för simulering av urlakning och avrinning av lösta ämnen. Om även desorptionen ska undersökas är det tillrådligt att den nedan beskrivna undersökningen utförs på varje system för vilket man kunnat göra en noggrann bestämning av K_d i det föregående adsorptionskinetiktestet.

Desorptionskinetiken kan, på samma sätt som adsorptionskinetiken, undersökas på två alternativa sätt: a) parallellmetoden och b) seriemetoden. Vilken metod som används får avgöras utifrån laboratoriets utrustning och resurser.

▼B

a) Parallellmetoden: För varje jord som har valts för desorptionsundersökning bereds ett antal prover med samma jord-lösningsförhållande. Antalet prover är samma som antalet tidpunkter vid vilka man önskar undersöka adsorptionskinetiken. Helst ska man använda samma tidsintervall som vid adsorptionskinetiktestet, även om totaltiden kan förlängas efter behov så att desorptionsjämvikt uppnås. För varje test (en jord och en lösning) körs ett blindprov. Detta består av jorden och 0,1 M $CaCl_2$-lösning, utan testämne, med samma vikt respektive volym som vid det riktiga testet. Som kontroll utförs samma testprocedur på enbart testämnet i 0,01 M $CaCl_2$-lösning (utan jord). Alla blandningar av jord med lösning rörs om tills adsorptionsjämvikt uppnås (enligt resultaten från skede 2). Därefter separeras faserna med centrifugering, och så mycket som möjligt av vattenfasen avlägsnas. Volymen avlägsnad lösning ersätts med en lika stor volym av 0,01 M $CaCl_2$ utan testämne, och den nya blandningen rörs om igen. Vattenfasen från det första röret tas till vara så fullständigt som möjligt och mäts efter t.ex. 2 timmar, vattenfasen från det andra röret efter 4 timmar, från det tredje efter 6 timmar osv., tills desorptionsjämvikt uppnås.

b) Seriemetoden: Efter adsorptionskinetiktestet centrifugeras blandningen, och så mycket som möjligt av vattenfasen avlägsnas. Den borttagna lösningens volym ersätts med lika stor volym av 0,01 M $CaCl_2$ utan testämne. Den nya blandningen rörs om tills desorptionsjämvikt uppnås. Under denna omröringstid centrifugeras blandningen med bestämda tidsintervall så att faserna separeras. Ett litet delprov av vattenfasen analyseras omedelbart med avseende på testämnet, och därefter fortsätts testet med den ursprungliga blandningen. Volymen för varje enskilt delprov ska vara mindre än 1 % av totalvolymen. Samma mängd av färsk 0,01 M $CaCl_2$-lösning tillsätts blandningen för att bibehålla förhållandet mellan jord och lösning, och omröringen fortsätts under nästa tidsintervall.

Den procentuella desorptionen beräknas för varje tidpunkt ((D_{t_i})) eller tidsintervall ($(D_{\Delta t_i})$) (beroende på vad som krävs för testet) och avsätts mot tiden i ett diagram. Likaså beräknas desorptionskoefficienten K_{des} vid jämvikt. De aktuella ekvationerna finns i avsnittet Data och rapportering och i tillägg 5.

Resultat från desorptionskinetiktest

Adsorptionsprocessens reversibilitet kan uppskattas med hjälp av ett diagram där den procentuella desorptionen D_{t_i} och adsorptionen A_{t_i} har avsatts mot tiden (i samma diagram). Om desorptionsjämvikt uppnås inom två gånger tiden för adsorptionsjämvikt, och den totala desorptionen ar mer än 75 % av den adsorberade mängden, anses adsorptionen vara reversibel.

1.9.4.3 Desorptionsisotermer

Freundlich-desorptionsisotermerna bestäms på de jordar som används i adsorptionsisotermtestet. Desorptionstestet utförs enligt beskrivningen i avsnittet Desorptionskinetik, med undantag av att vattenfasen bara analyseras en gång, vid desorptionsjämvikt. Mängden av desorberat testämne beräknas. Halten av kvarvarande adsorberat testämne i jorden vid desorptionsjämvikt avsätts i ett diagram mot testämnets jämviktskoncentration i lösningen (se Data och rapportering samt tillägg 5).

▼B

2. **DATA OCH RAPPORTERING**

Data från analysen ska presenteras i tabellform (se bilaga 6). De enskilda mätningarna och beräknade medeltal ska anges. Adsorptionsisotermerna ska presenteras i diagramform. Beräkningarna ska göras på nedan beskrivet sätt.

Vid beräkningarna antas att vikten av 1 cm^3 vattenlösning är 1 g. Därför kan jord-lösningsförhållandet uttryckas med samma värde oberoende av om vikt/vikt eller vikt/volym valts som måttenhet.

2.1 ADSORPTION

Adsorptionen (A_{t_i}) uttrycks i procent och definieras såsom förhållandet mellan den mängd av ämne som under testbetingelserna har adsorberats i jorden och den mängd som fanns närvarande vid testets början. Om testämnet är stabilt och inte i någon signifikant grad adsorberas på kärlets väggar beräknas A_{t_i} vid varje tidpunkt t_i enligt följande ekvation:

$$A_{t_i} = \frac{m_s^{ads}(t_i) \cdot 100}{m_0} (\%) \quad (3)$$

där:

A_{t_i} = den procentuella adsorptionen vid tidpunkten t_i (%),

$m_s^{ads}(t_i)$ = massan av testämne som adsorberats i jorden vid tidpunkten t_i (μg),

m_0 = massan av testämne i provröret, vid testets början (μg).

Närmare anvisningar för hur den procentuella adsorptionen A_{t_i} beräknas för parallell- respektive seriemetoden finns i tillägg 5.

Fördelningskoefficienten K_d är förhållandet mellan ämnets halt i jordfasen och ämnets masskoncentration i vattenlösningen när adsorptionsjämvikt har inträtt, under testbetingelserna.

$$K_d = \frac{C_s^{ads}(eq)}{C_{aq}^{ads}(eq)} = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_{aq}^{ads}(eq)} \cdot \frac{V_0}{m_{soil}} (cm^3\ g^{-1}) \quad (4)$$

där:

$C_s^{ads}(eq)$ = halten av adsorberat ämne i jord vid adsorptionsjämvikt (μg g^{-1}),

$C_{aq}^{ads}(eq)$ = ämnets masskoncentration i vattenfasen vid adsorptionsjämvikt (μg cm^{-3}). Koncentrationen bestäms på analytisk väg med beaktande av värdet från blindprovet.

$m_s^{ads}(eq)$ = massan av ämne som adsorberats i jord vid adsorptionsjämvikt (μg),

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = ämnets massa i lösningen vid adsorptionsjämvikt (μg),

m_{jord} = mängd av jordfas, uttryckt som torr jordmassa (g),

v_0 = ursprunglig volym av vattenfas i kontakt med jord (cm^3).

Sambandet mellan A_{eq} och K_d ges av:

$$K_d = \frac{A_{eq}}{100 - A_{eq}} \cdot \frac{V_0}{m_{jord}} (cm^3\ g^{-1}) \quad (5)$$

▼B

där:

A_{eq} = procentuell adsorption vid adsorptionsjämvikt, %.

Den normaliserade adsorptionskoefficienten för organiskt kol K_{oc} bestämmer sambandet mellan fördelningskoefficienten K_d och halten av organiskt kol i jordprovet:

$$K_{oc} = K_d \cdot \frac{100}{\%OC} (cm^3\ g^{-1}) \quad (6)$$

där:

% oc = procentuell andel organiskt kol i jordprovet (g g^{-1}).

Koefficienten K_{oc} representerar ett värde som beskriver hur huvudsakligen opolära organiska ämnen fördelas mellan a ena sidan jordens eller sedimentets organiska kol och å andra sidan vattnet. Sådana ämnens adsorption är beroende av den sorberande fasta fasens organiska innehåll (7), och därför beror K_{oc}-värdet på de humösa fraktionernas specifika egenskaper, eftersom sorptionskapaciteten hos dessa fraktioner kan variera kraftigt beroende på deras olika ursprung, uppkomst osv.

2.1.1 **Adsorptionsisotermer**

Ekvationen för Freundlich-adsorptionsisotermer ger sambandet mellan mängden av adsorberat testämne och testämnets koncentration i lösningen vid jämvikt (ekvation 8).

Data behandlas på samma sätt som i punkten ”Adsorption” ovan, och halten av adsorberat testämne i jorden efter adsorptionstestet $C_s^{ads}(eq)$, på andra ställen betecknat som x/m) beräknas för varje provrör, under antagandet att jämvikt har inträtt och att$C_s^{ads}(eq)$representerar jämviktsvärdet:

$$C_s^{ads}(eq) = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_{jord}} = \frac{[C_0 - C_{aq}^{ads}(eq)].V_0}{m_{jord}} (\mu g\ g^{-1}) \quad (7)$$

Freundlich-adsorptionsekvationen (8) ser ut så här:

$$C_s^{ads}(eq) = K_F^{ads}.C_{aq}^{ads}(eq)^{1/n} (\mu g\ g^{-1}) \quad (8)$$

eller i linjär form:

$$\log C_s^{ads}(eq) = \log K_F^{ads} + 1/n \cdot \log C_{aq}^{ads}(eq) \quad (9)$$

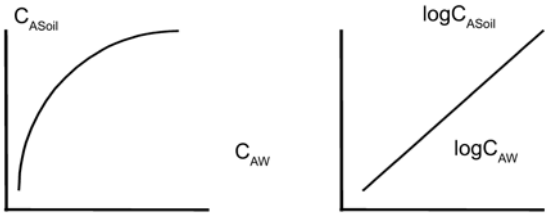
där:

K_F^{ads} = Freundlich-adsorptionskoefficienten, som anges i dimensionen $cm^3\ g^{-1}$ bara om exponenten l/n = 1. I alla andra fall införs l/n i dimensionen förK_F^{ads} ($\mu g^{1-1/n}\ (cm^3)^{1/n}\ g^{-1}$)

n = regressionskoefficienten. l/n ligger i regel mellan 0,7 och 1,0 som indikation på att sorptionsdata ofta är något olinjära.

Ekvationerna (8) och (9) ritas upp i diagram, och värdena på K_F^{ads}och l/n beräknas med regressionsanalys med hjälp av ekvation 9. Likaså beräknas den logaritmiska ekvationens korrelationskoefficient r. Exempel på kurvor av detta slag finns i figur 2.

▼B



Figur 2 Freundlich-adsorptionskurva (normal respektive linjanserad)

2.1.2 **Massbalans**

Massbalansen (MB) anges i procent och definieras som förhållandet mellan den mängd av ämnet som analytiskt kan tas till vara efter adsorptionstestet och den nominella mängden av ämnet vid testets början.

Behandlingen av resultaten blir annorlunda om lösningsmedlet är fullständigt blandbart med vatten. Då kan man behandla resultaten på samma sätt som i punkten ”Desorption” för att bestämma den mängd av ämnet som tagits till vara genom extraktion av lösningsmedel. Om lösningsmedlet är mindre blandbart med vatten krävs en bestämning av den tillvaratagna mängden.

Massbalansen MB för adsorptionen beräknas enligt följande ekvation, under antagandet att termen (m_E) motsvarar summan av de testämnesmassor som extraherats ur jorden och från testkärlets yta med hjälp av ett organiskt lösningsmedel:

$$MB = \frac{(V_{rec} \cdot C_{aq}^{ads}(eq) + m_E) \cdot 100}{V_0 \cdot C_0}\,(\%) \qquad (10)$$

där:

MB = massbalans (%)

m_E = total massa av testämne som extraherats ur jorden och från testkärlets väggar i två steg (μg),

C_0 = ursprunglig masskoncentration i testlösningen som är i kontakt med jord (μg cm^3),

V_{rec} = volymen supernatant som tagits till vara efter adsorptionsjämvikt (cm^{-3}).

2.2 DESORPTION

Desorptionen (D) uttrycks i procent och definieras som förhållandet mellan den desorberade mängden av testämnet och den tidigare adsorberade mängden av ämnet, under testbetingelserna:

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100(\%) \qquad (11)$$

där:

D_{ti} = procentuell desorption vid tidpunkten t_i (%),

▼B

$m_{aq}^{des}(t_i)$ = massan av testämne som desorberats ur jorden vid tidpunkten t_i (µg),

$m_s^{ads}(eq)$ = massan av testämne som adsorberats i jorden vid adsorptionsjämvikt (µg).

Närmare anvisningar för sättet att beräkna den procentuella desorptionen D_{t^i} för parallell- och seriemetoden finns i bilaga 5.

Den skenbara desorptionskoefficienten (K_{des}) är, under de aktuella testbetingelserna, förhållandet mellan massan av ämne som finns kvar i jordfasen och massan av desorberat ämne i vattenlösningen, när desorptionsjämvikt har inträtt:

$$K_{des} = \frac{m_s^{ads}(eq) - m_{aq}^{des}(eq)}{m_{aq}^{des}(eq)} \frac{V_T}{m_{soil}} (cm^3\ g^{-1}) \quad (12)$$

där:

K_{des} = desorptionskoefficient ($cm^3\ g^{-1}$):

$m_{aq}^{des}(eq)$ = totala massan av testämne som desorberats ur jord vid desorptionsjämvikt (µg),

V_r = totala volymen av vattenfas i kontakt med jord under desorptionskinetiktestet (cm^3).

Anvisningar för beräkning av$m_{aq}^{des}(eq)$finns i tillagg 5 under rubriken ”Desorption”.

Anmärkning:

Om adsorptionstestet som föregår desorptionstestet utförts med parallellmetoden, kan volymen V_T i ekvation (12) sättas lika med V_o.

2.2.1 **Desorptionsisotermer**

Ekvationen för Frcundlich-desorptionsisotermer beskriver sambandet mellan mängden av testämne som förblir adsorberat i jorden och koncentrationen av testämne i lösningen vid desorptionsjämvikt (ekvation 16).

Halten av ämne som förblir adsorberat i jorden vid desorptionsjämvikt beräknas för varje provrör enligt följande:

$$C_s^{des}(eq) = \frac{m_s^{ads}(eq) - m_{aq}^{des}(eq)}{m_{soil}} (\mu g\ g^{-1}) \quad (13)$$

$m_{aq}^{des}(eq)$ definieras som:

$$m_{aq}^{des}(eq) = m_m^{des}(eq) \cdot \frac{V_0}{V_r^F} - m_{aq}^A(\mu g) \quad (14)$$

där:

$C_s^{des}(eq)$ = balten av testämne som förblir adsorberat i jorden vid desorptionsjämvikt (µg g^{-1}),

$m_m^{des}(eq)$ = massan av ämne som bestämts analytiskt i vattenfasen vid desorptionsjämvikt (µg),

▼B

m_{aq}^{A} = massan av testämne som blivit över (efter att adsorptionsjämvikt inträtt) på grund av ofullständig volymersättning (μg),

$m_{aq}^{des}(eq)$ = massan av ämne i lösningen vid adsorptionsjämvikt (μg),

$$m_{aq}^{A} = m_{aq}^{ads}(eq) \cdot \left(\frac{V_0 - V_R}{V_0}\right) \quad (15)$$

V_r^F = volymen av lösning som tagits ur röret för uppmätning av testämnet vid desorptionsjämvikt (cm^3),

V_R = volymen av supernatant som avlägsnats ur röret efter att adsorptionsjämvikt inträtt och som ersatts med samma volym av 0,01 M $CaCl_2$-lösning (cm^3).

Freundlich-desorptionsekvationen (16) ser ut så här:

$$C_s^{des}(eq) = K_F^{des} \cdot C_{aq}^{des}(eq)^{1/n} (\mu g\ g^{-1}) \quad (16)$$

eller i linjär form:

$$\log C_s^{des}(eq) = \log K_F^{des} + 1/n \cdot \log C_{aq}^{des}(eq) \quad (17)$$

där:

K_F^{des} = Freundlich-desorptionskoefficienten.

n = regressionskoefficienren,

$C_{aq}^{des}(eq)$ = ämnets masskoncentration i vattenfasen vid desorptionsjämvikt (μg cm^{-3}).

Ekvationerna 16 och 17 kan ritas upp i diagram, och värdet på K_F^{des} och l/n beräknas med regressionsanalys med hjälp av ekvation 17.

Anmärkning:

Om Freundlichs adsorptions- eller desorptionsexponent l/n är lika med 1, blir Freundlichs adsorptions- eller desorptionskoefficient (K_F^{ads} respektive K_F^{des}) lika med adsorptionens respektive desorptionens jämviktskoefficient (K_d och K_{des}), och kurvorna över C_s som funktion av C_{aq} blir linjära. Om exponenten är skild från 1, blir kurvorna över C_s som funktion av C_{aq} olinjära, och adsorptions- och desorptionskoefficienterna kommer att variera längs isotermerna.

2.2.2 **Rapport**

Testrapporten ska innehålla följande uppgifter:

— Fullständiga uppgifter om jordproverna, inbegripet följande:

— områdets geografiska läge (latitud och longitud),

— provtagningsdatum,

▼B

— bruksändamål (t.ex. jordbruk, skog osv.),

— provtagningsdjup,

— halt av sand, silt och clay,

— pH-värden (i 0,01 M $CaCl_2$),

— halt av organiskt kol,

— halt av organiskt material,

— kvävehalt,

— kol-kväveförhållande,

— katjonbyteskapacitet (mmol/kg),

— alla uppgifter av betydelse som ror provtagning och förvaring av jordproverna,

— i förekommande fall, alla uppgifter av betydelse för tolkning av testämnets adsorption och desorption,

— uppgift om vilka metoder som använts för bestämning av enskilda parametrar.

— Relevanta uppgifter om testämnet

— Testtemperaturen

— Centrifugeringsbetingelser

— Analysprocedurer som använts för analys av testämnet

— I förekommande fall motivering för användning av hjälplösningsmedel för beredning av testämnets stam lösning

— 1 förekommande fall förklaringar av korrigeringar som gjorts i beräkningarna

— Data enligt blanketten (bilaga 6) och diagram

— Alla uppgifter och observationer som kan vara till hjälp för att tolka testresultaten.

3. **HÄNVISNINGAR**

1. Kukowski H. and Brummer C. (1987), Investigations on the Adsorption and Desorption of Selected Chemicals in Soils. UBA Report 106 02 04 5, Part II.

2. Fränzle O., Kuhnt G. and Vetter L. (1987), Selection of Representative Soils in the LC-Territory. UBA Report 106 02045, 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 January 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. J. Hance ed.), Academic Press, London, s. 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, s. 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), s. 29–35.

16. McCall P.]., 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, s. 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, s. 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, s. 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, s. 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, s. 269–273.

23. Burkhard N. and Guth J. A. (1981), ”Chemical hydrolysis of 2-Chloro-4,6-bis(alkylamino)-l,3,5-triazine herbicides and their breakdown in soil under the influence of adsorption”. Pestic. Sci. 12, s. 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, s. 961–971.

25. Osgerby J. M. (1973), ”Process affecting herbicide action in soil”. Pestic. Sci., 4, s. 247–258.

26. Guth J. A. (1972), ”Adsorptions- und Einwascheverhalten von Pflanzenschutzmitteln in Böden”. Schr. Reihe Ver. Wass.-Boden-Lufthyg. Berlin-Dahlem, Heft 37, s. 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), s. 135–172, Plenum Press, NY.

28. Helling C. S. (1971). ”Pesticide mobility in soils”. Soil Sci. Soc. Amer. Proc., 35, s. 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, s. 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, s. 37–44.

31. Cohen S. Z., Creeger S. M., Carsel R.F. and Enfield CG. (1984), ”Potential pesticide contamination of groundwater from agricultural uses”, in Treatment and Disposal of Pesticide Wastes, s. 297–325, Acs Symp. Ser. 2 59, American Chemical Society, Washington, DC.

32. Gustafson D. I. (1989), ”Groundwater ubiquity score: a simple method for assessing pesticide leachability”. J. Environ. Toxic. Chem., 8(4), s. 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, s. 340–350.

34. Bromilov R. H. and Leistra M. (1980), ”Measured and simulated behavior of aldicarb and its oxydation products in fallow soils”. Pest. Sei., 11, s. 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, s. 80–101,

36. Lambert S. M. (1967), ”Functional relationship between sorption in soil and chemical structure”. J. Agri. Food Chem., 15, s. 572–576.

▼B

37. Hance R. J.(1969), ”An empirical relationship between chemical structure and the sorption of some herbicides by soils”, Agri. Food Chem., 17, s. 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 experimental relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficients, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor”, J. Agric. Food Chem., 29, s. 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, s. 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, s. 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: s. 222–234.

43. Karickhoff S. W. (1981), ”Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils”, Chemosphere 10, s. 833–846.

44. Paya-Perez A., Riaz M. and I.arsen B. (1989), ”Soil Sorption of 6 Chlorobenzenes and 20 PCB Congeners”. Environ. Toxicol. Safety 21, s. 1–17.

45. Hamaker). 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 och II, Marcel Dekker, Inc., New York, NY, 1972, s. 49–143.

46. Deli)., and Warren G. F. (1971), ”Adsorption, desorption and leaching of diphenamid in soils”. Weed Sci. 19: s. 67–69.

47. Chu-Huang Wu, Buchring N., Davinson J. M. and Santelmann (1975), ”Napropamide Adsorption, desorption and Movement m soils”. Weed Science, Vol. 23, s. 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, s. 75, International. Atomic Energy Agency, Wien.

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, \VI, 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, s. 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., s. 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, s. 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, s. 227–231.

64. Brown D. S. and Flagg E. W. (1981), ”Empirical prediction of organic pollutants sorption in natural sediments”, J. Environ.Qual., 10(3), s. 382–386.

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), s. 227–231.

66. Gerstl Z. and Mingelgrin U. (1984), ”Sorption of organic substances by soils and sediments”, J. Environm. Sci. Health, B19 (3), s. 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), s. 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 J.G. Eaton, et al.), s. 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, s. 831–832.

71. Hassett). J., Banwart W. I., Wood S. G. and Means J. C. (1981), ”Sorption of/-Naphtol: implications concerning the limits of hydrophobic sorption”, Soil Sci. Soc. Am. J. 45, s. 38–42.

72. Karickhoff S. W. (1981), ”Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils”, Chemosphere, Vol. 10(8), s. 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), s. 319–322.

74. Müller M., Kordel W. (1996), ”Comparison of screening methods for the determination/estimation of adsorption coefficients on soil”. Chemosphere, 32(12), s. 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), s. 1373–1384.

76. Kördel W., Stutte J., Kotthoff C. (1993), ”HPLC – screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil – comparison of different stationary phases”. Chemosphere 27 (12), s. 2341–2352.

77. Hance. R. J. (1967), ”The Speed of Attainment of Sorption Equilibria in Some Systems Involving Herbicides”, Weed Research, Vol. 7, s. 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, s. 297–325, ACS Symp. Ser. 2 59, 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, s. 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. Soo, s. 3973–3993.

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, s. 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.

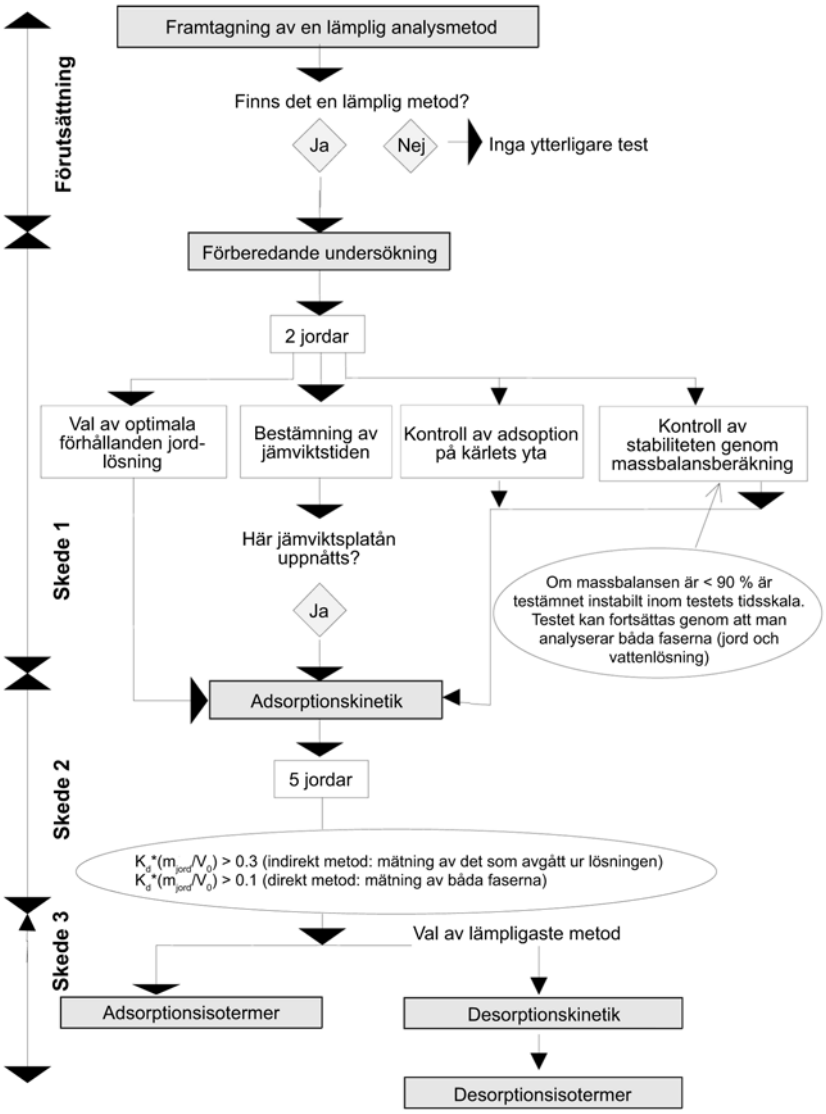
84. Guth, J. A. (1985), ”Adsorption/desorption”, in Joint International Symposium, Physicochemical Properties and their Role in Environmental Hazard Assessment, July 1–3, Canterbury, UK.

85. Soil Texture Classification (US and FAO systems): Weed Science, 3 3, Suppl. 1 (1985) and Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 26:305 (1962).

▼B

Bilaga 1

Testschema



▼B

Bilaga 2

ADSORPTIONSRESULTATENS NOGGRANNHET SOM FUNKTION AV ANALYSMETODENS NOGGRANNHET OCH KONCENTRATIONSÄNDRINGEN

Av tabellen nedan (84) framgår klart att när skillnaden mellan massan vid testets början (m_0 = 110 µg) och testämnets massa $m_{aq}^{ads}(eq)$ i lösningen vid jämvikt (=100 µg)är mycket liten, så leder ett fel på 5 % vid mätning av jämviktskoncentrationen till ett fel på 50 % i beräkningen av massan av ämne som adsorberats i jorden ($m_s^{ads}(eq)$) och ett fel på 52,4 % i beräkningen av K_d.

Mängd jord	m_{jord}	10 g
Lösningens volym	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‡
	FÖR A = 9 %							
m_0 = 110 µg eller C_0=1,100 µg/cm^3	100	1,000	verkligt värde	10	1,00	verkligt värde	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 %
	FÖR A = 55 %							
m_0= 110 µg eller C_0=1,100µg/cm^3	50,0	0,500	verkligt värde	60,0	6,00	verkligt värde	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 %
	FÖR A = 99 %							
m_0 = 110 µg eller C_0=1,100 µg/cm^3	1,100	0,011	verkligt värde	108,9	10,89	verkligt värde	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 %

$$*m_s^{ads}(eq) = m_0 - m_{aq}^{ads}(eq), C_s^{ads}(eq) = \frac{\left[C_0 - C_{aq}^{ads}(eq)\right] V_0}{m_{soil}} \cdot Kd = \frac{m_s^{ads}(eq)\ _{V_0}}{m_{aq}^{ads}(eq)^{m_{soil}}}$$

$m_s^{ads}(eq)$ = testämnets massa i jordfasen vid jämvikt, µg;

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = testämnets massa i vattenfasen vid jämvikt, µg;

$C_s^{ads}(eq)$ = testämnets halt i jordfasen vid jämvikt, µg g^{-1};

$C_{aq}^{ads}(eq)$ = testämnets masskoncentration i vattenfasen vid jämvikt, µg cm^{-3};

R = analysfel vid bestämning av $m_{aq}^{ads}(eq)$;

R‡ = beräkningsfel på grund av analysfelet R.

▼B

Bilaga 3

ESTIMERINGSMETODER FÖR K_d

1. Genom estimeringsmetoder kan K_d uppskattas på grundval av samband med t.ex. P_{ow}-värden (12) (39) (63–68), vattenlöslighetsdata (12) (19) (21) (39) (68–73) eller polaritetsdata som fåtts fram från HPLC-RP (omvänd fas) (74–76). K_{oc} och K_{om} beräknas med hjälp av ekvationerna i tabell 1 och 2, och sedan räknas K_d fram indirekt ur följande ekvationer:

$$K_{oc} = K_d \cdot \frac{100}{\%oc}\,(cm^3 g^{-1}) \qquad K_{om} = \frac{K_d}{1{,}724} \cdot \frac{100}{\%oc}\,(cm^3 g^{-1})$$

2. Principen för dessa samband grundar sig på två antaganden: 1) det är främst jordens organiska material som påverkar hur ett ämne adsorberas, och 2) de växelverkansprocesser som förekommer är i huvudsak opolära. Det innebär att dessa samband 1) inte, eller bara delvis, kan tillämpas på polära ämnen, och 2) inte kan tillämpas i fall där jordens halt av organiskt material är mycket låg (12). Vidare gälier att samma sak inte kan konstateras angående sambandet mellan vattenlöslighet och adsorptionens omfattning (19) (21), även om man har funnit tillfredsställande korrelation mellan P_{ow} och adsorption (19). Hittills gjorda undersökningar har gett motsägelsefulla resultat.

3. 1 tabell 1 ges några exempel på samband mellan adsorptionens fördelningskoefficient och fördelningskoefficienten oktanol-vatten. I tabell 2 ges några exempel på samband mellan adsorptionens fördelningskoefficient och vattenlösligheten.

Tabell 1

Exempel på samband mellan adsorptionens fördelningsskoefficient och fördelningskoefficienten oktanol-vatten. Ytterligare exempel finns i (12) (68).

Ämne	Samband	Författare
Substituerad urea	$\log K_{om} = 0{,}69 + 0{,}52 \log P_{ow}$	Briggs (1981) (39)
Aromatiska klorerade ämnen	$\log K_{oc} = -0{,}779 + 0{,}904 \log P_{ow}$	Chiou *et al.* (1983) (65)
Diverse bekämpningsmedel	$\log K_{om} = 4{,}4 + 0{,}72 \log P_{ow}$	Gerstl och Mingelgrin (1984) (66)
Aromatiska kolväten	$\log K_{oc} = -2{,}53 + 1{,}15 \log P_{ow}$	Vowles och Mantoura (1987) (67)

Tabell 2

Exempel på samband mellan adsorptionens fördelningskoefficient och vattenlösligheten. Ytterligare exempel finns i (68) (69).

Ämne	Samband	Författare
Diverse bekämpningsmedel	$\log K_{om} = 3{,}8 - 0{,}561 \log S_w$	Gerstl och Mingelgrin (1984) (66)
Alifatiska, aromatiska, klorerade ämnen	$\log K_{om} = (4{,}040 +/- 0{,}038) - (0{,}557 +/- 0{,}012) \log S_w$	Chiou *et al.* (1979) (70)
u-naphtol	$\log K_{oc} = 4{,}273 - 0{,}686 \log S_w$	Hasset et al. (1981) (71)
Cykliska, alifatiska aromatiska ämnen	$\log K_{oc} = -1{,}405 - 0{,}921 \log S_w - 0{,}00953$ (mp-25)	Karickhoff (1981) (72)
Diverse föreningar	$\log K_{om} = 2{,}75 - 0{,}45 \log S_w$	Moreale van Blade (1982) (73)

▼B

Bilaga 4

BERÄKNINGAR FÖR BESTÄMNING AV CENTRIFUGERINGS-BETINGELSER

1. Centrifugeringstiden fås fram genom följande formel, under antagande att partiklama är sfäriska:

$$t = \frac{9}{2}\left[\frac{\eta}{\omega^2 r p^2 (\rho_s - \rho_{aq})}\right] \ln(R_b/R_t) \qquad (1)$$

Av praktiska skäl ges parametrarna i måttenheterna g, cm etc. i stället för de normala SI-enheterna.

där:

ώ = rotationshastighet (=2 Ti rpm/60), rad s^{-1}

rpm = varv per minut

η = lösningens viskositet, g s^{-1} cm^{-1}

r_p = partikelradie, cm

p_s = jordens densitet, g cm^3

p_{aq} = lösningens densitet, g cm^{-3}

R_t = avstånd från centrifugrotorns centrum till lösningens övre yta i centrifugeringsröret, cm

R_b = avstånd från centrifugrotorns centrum till centrifugeringsrörets botten, cm

R_b-R_t = jord-lösningsblandningens höjd i centrifugeringsröret, cm.

För att säkerställa fullständig separation får centrifugen som regel gå två gånger den framräknade tiden.

2. Ekvation 1 kan förenklas ytterligare om lösningens viskositet (η) och densitet (p_{aq}) kan anses vara samma som viskositeten och densiteten för vatten vid 25 °C, dvs. $\eta = 8{,}95 \times 10^{-3}$ g s^{-1} cm^{-1} och p_{aq} = 1,0 g, cm^{-3}.

Då fås centrifugeringstiden genom ekvation 2:

$$t = \frac{3.7}{(\text{rpm})^2 \,.r_p{}^2(\rho_s - 1)} \ln\frac{Rb}{Rt} \qquad (2)$$

3. Av ekvation 2 framgår tydligt att det är två faktorer som har stor betydelse när det gäller att bestämma de centrifugeringsbetingelser, dvs. tid (t) och varvtal (rpm), som behövs för att åstadkomma separation av partiklar av en viss storlek (i detta fall med radien 0,1 μm): 1) jordens densitet och 2) blandningens höjd i centrifugeringsröret (R_b-R_t), dvs. det avstånd som en jordpartikel färdas från lösningens övre yta till rörets botten. För en given volym bestäms blandningens höjd självfallet av rörets radie.

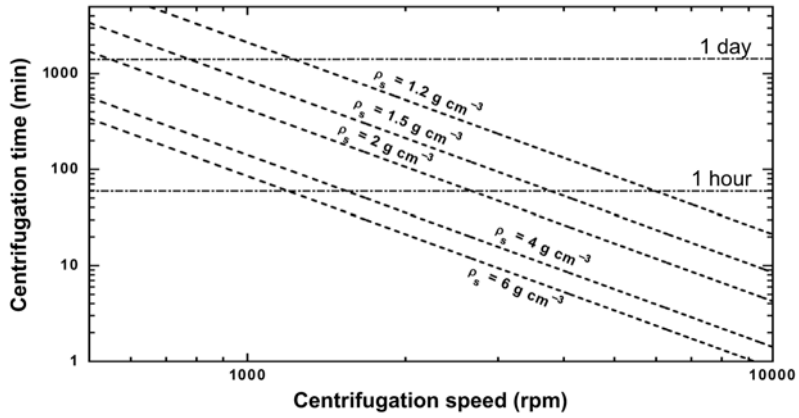
4. I figur 1 visas centrifugeringstiden (t) som funktion av varvtalet (rpm) för olika jorddensiteter (p_s) (figur 1 a) och för olika blandningshöjder i centrifugeringsröret (figur 2 a). Av figur 1 a framgår inverkan av jordens densitet tydligt – vid klassisk centrifugering med 3 000 rpm är centrifugeringstiden cirka 240 minuter när jordens densitet är 1,2 g cm^3, men bara 50 minuter när densiteten är 2,0 g cm^3. Likaså visar figur 1 b att centrifugeringstiden vid klassisk centrifugering med 3 000 rpm är cirka 50 minuter om blandningens höjd är 10 cm men bara 7 minuter om höjden är 1 cm. Det är dock viktigt att finna en optimal avvägning mellan å ena sidan så liten blandningshöjd som möjligt för centrifugeringen och å andra sidan enkel hantering när det gäller att separera faserna efter centrifugering.

▼B

5. När testbetingelserna för separering av jord- och lösningsfaserna ska bestämmas är det också viktigt att beakta eventuell förekomst av en tredje ”pseudofas”, dvs. kolloider. Dessa partiklar är mindre än 0,2 μm och kan ha viktig inverkan på hela adsorptionsmekanismen för ett ämne i en jordsuspension. När centrifugeringen utförs på ovan beskrivet sätt blir kolloiderna kvar i vattenfasen och analyseras då tillsammans med den. Då går informationen om deras inverkan förlorad.

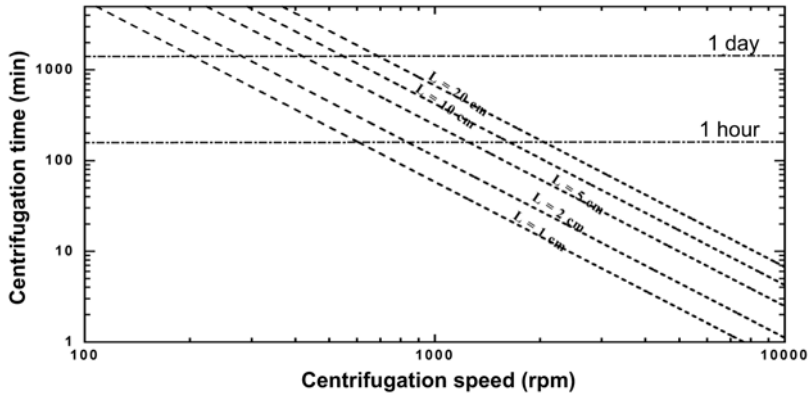
   Om laboratoriet har möjligheter till ultracentrifugering eller ultrafiltrering kan adsorptionen och desorptionen av ett ämne i jord studeras mer ingående, även beträffande ämnets adsorption på kolloiderna. Då ska ultracentrifugering med 60 000 rpm/min eller ultrafiltrering med filterporositeten 100 000 dalton användas för att separera de tre faserna jord, kolloider och lösning. Då ska också testschemat ändras så att alla tre faserna tas med i ämnesanalysen.

Figur 1a.



Samband mellan centrifugeringstid (t) och centrifugeringsvarvtal (rpm) för olika jorddensiteter (ρ_s). R_t = 10 cm, R_b-R_t = 10 cm, q = 8,95 × 10^{-3} g s^{-1} cm^{-1} och ρ_{aq} = 1,0 g cm^{-3} vid 25 °C.

Figur 1b.



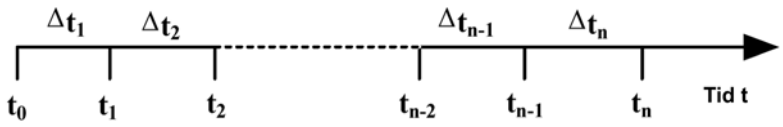
Samband mellan centrifugeringstid (t) och ccntrifugeringsvarvtal (rpm) för olika höjder på blandningen i centrifugeringsröret (R_b – R_1) = L; R_t = 10 cm, η = 8,95 × 10^{-3} g s^{-1} cm^{-1}, ρ_{aq} = 1,0 g cm^{-3} vid 25 °C och ρ_s = 2,0 g cm^{-3}.

▼B

Bilaga 5

BERÄKNING AV ADSORPTION A (%) OCH DESORPTION D (%)

Procedurens tidsschema är följande:



För samtliga beräkningar gäller antagandet att testämnet är stabilt och att det inte i någon signifikant grad adsorberas på kärlets väggar.

ADSORPTION A (A %)

a) *Parallellmetoden*

Den procentuella adsorptionen beräknas för varje provrör (i) vid varje tidpunkt (t_i), enligt följande ekvation:

$$A_{t_i} = \frac{m_s^{ads}(t_i) \cdot 100}{m_0} \ (\%) \qquad (1)$$

Ekvationens termer beräknas enligt följande:

$$m_0 = C_0 \cdot V_0 \ (\mu g) \qquad (2)$$

$$m_s{}^{ads}(t_i) = m_0 - C_{aq}{}^{ads}(t_i) \cdot V_0 \ (\mu g) \qquad (3)$$

där:

A_{ti} den procentuella adsorptionen (%) vid tidpunkten t_1

,

$m_s^{ads}(t_i)$ testämnets massa i jorden vid tidpunkten t_i då analysen utförs (μg),

m_0 testämnets massa i provröret vid testets början (μg),

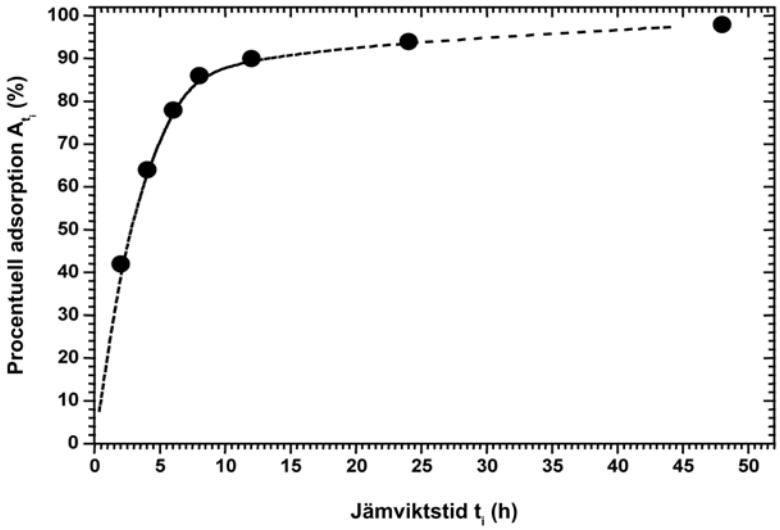
C_0 ursprunglig masskoncentration i testlösningen som är i kontakt med jorden (μg cm^{-3}).

▼B

$C_{aq}^{ads}(t_i)$ ämnets masskoncentration i vattenfasen vid tidpunkten t_i då analysen utförs (μg cm^{-3}), denna koncentration bestäms analytiskt med beaktande av värdena från blindproven.

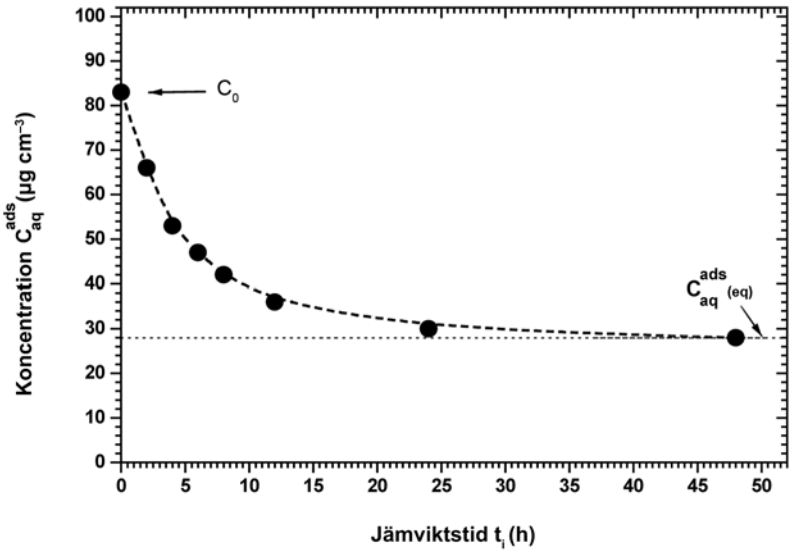
V_0 ursprunglig volym för den testlösning som är i kontakt med jorden (cm^3).

Värdet på den procentuella adsorptionen A_{t_i} eller $C_{aq}^{ads}((t_i))$ avsätts mot tiden i ett diagram, och kurvan används för att bestämma tiden för när sorptionsjämvikt inträder. Exempel på sådana kurvor finns i figur 1 och figur 2.



Figur 1

Kurva för bestämning av adsorptionsjämvikt



Figur 2

Testämnets masskoncentration i vattenfasen (C_{aq}) som funktion av tiden.

▼B

b) *Seriemetoden*

I ekvationerna som följer är utgångspunkten att adsorptionen undersöks genom mätning av testämnet i små delprover av vattenfasen med bestämda tidsintervall.

— Den mängd ämne som adsorberats i jorden under varje tidsintervall beräknas på följande sätt:

— för det första tidsintervallet $\Delta t_1 = t_1 - t_0$

$$m_s^{ads}(\Delta t_1) = m_0 - m_m^{ads}(t_1) \cdot \left(\frac{V_0}{v_a^A}\right) \quad (4)$$

— för det andra tidsintervallet $\Delta t_2 = t_2 - t_1$

$$m_s^{ads}(\Delta t_2) = m_m^{ads}(t_1) \cdot \left(\frac{V_0}{v_a^A}\right) - m_m^{ads}(t_2) \cdot \left(\frac{V_0 - v_a^A}{v_a^A}\right) \quad (5)$$

— för det tredje tidsintervallet $\Delta t_3 = t_3 - t_2$

$$m_s^{ads}(\Delta t_3) = m_m^{ads}(t_2) \cdot \left(\frac{V_0 - v_a^A}{v_a^A}\right) - m_m^{ads}(t_3) \cdot \left(\frac{V_0 - 2 \cdot v_a^A}{v_a^A}\right) \quad (6)$$

— för det n:te tidsintervallet $\Delta t_n = t_n - t_n\text{-}1$

$$m_s^{ads}(\Delta t_n) = m_m^{ads}(t_{n-1}) \cdot \left(\frac{V_0 - (n-2) \cdot v_a^A}{v_a^A}\right) - m_m^{ads}(t_n) \cdot \left(\frac{(V_0 - (n-1) \cdot v_a^A)}{v_a^A}\right) \quad (7)$$

— Den procentuella adsorptionen under varje tidsintervall $A_{\Delta t_i}$ beräknas genom ekvationen

$$A_{\Delta t_i} = \frac{m_s^{ads}(\Delta t_i)}{m_0} \cdot 100\ (\%) \quad (8)$$

och den procentuella adsorptionen vid tidpunkten t_i (A_{t_i}) fås genom ekvationen

$$A_{t_i} = \frac{\sum_{j=\Delta t_1}^{\Delta t_i} m_s^{ads}(j)}{m_0} \cdot 100\ (\%) \quad (9)$$

Adsorptionsvärdena A_{t_i} eller $A_{\Delta t_i}$ (beroende på vad som krävs i undersökningen) ritas upp som funktion av tiden i ett diagram, och kurvan används för att bestämma tidpunkten för när sorptionsjämvikt inträder.

— Vid jämviktstiden t_{eq} gäller följande:

— massan av testämne som adsorberats i jorden:

$$m_s^{ads}(eq) = \sum_{\Delta t_i=1}^{n} m_s^{ads}(\Delta t_i) \quad (10)$$

▼B

— och den procentuella adsorptionen vid jämvikt:

$$m_{aq}^{ads}(eq) = m_0 - \sum_{\Delta t_i=1}^{n} m_s^{ads}(\Delta t_i) \quad (11)$$

— massan av testämne i lösningen:

$$A_{eq} = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_0} \cdot 100(\%) \quad (12)$$

De ovan använda parametrarna definieras enligt följande:

$m_s^{ads}(\Delta t_1), m_s^{ads}(\Delta t_2), ..., m_s^{ads}(\Delta t_n)$	massan av ämne som adsorberats i jorden under tidsintervallen Δ_{t1}, $\Delta_{t2,...}$,Δ_{tn} (µg),
$m_m^{ads}(t_1), m_m^{ads}(t_2), ..., m_n^{ads}(t_n)$	massan av ämne som uppmätts i ett delprov v_a^A vid tidpunkterna t_1 Δt_2 ..., t_n (µg),
$m_s^{ads}(eq)$	massan av ämne som adsorberats i jorden vid adsorptionsjämvikt (µg),
$m_{aq}^{ads}(eq)$	massan av ämne i lösningen vid adsorptionsjämvikt (µg),
v_a^A	volymen av det delprov i vilket testämnet uppmäts (cm^3),
$A_{\Delta t_i}$	procentuell adsorption under tidsintervallet Δt_i (%),
A_{eq}	procentuell adsorption vid adsorptionsjämvikt (%).

DESORPTION D (A %)

Som starttid t_0 för desorptionskinetiktestet räknas den tidpunkt då den maximala tillvaratagna volymen av testämneslösning (efter att adsorptionsjämvikt har inträtt) ersätts med en lika stor volym 0,01 M $CaCl_2$-lösning.

a) *Parallellmetoden*

Vid tidpunkten t_i uppmäts massan av testämnet i volymen av den vattenfas som tagits ur rör i (V_r^i), och den desorberade massan beräknas enligt följande ekvation:

$$m_{aq}^{des}(t_i) = m_m^{des}(t_i) \cdot \left(\frac{V_0}{v_r^i}\right) - m_{aq}^A \quad (13)$$

Vid desorptionsjämvikt är $t_i = t_{eq}$ och därför är $m_{aq}^{des}(t_i) = m_{aq}^{des}(eq)$.

Massan av testämne som har desorberats under ett tidsintervall (Δt_i) ges av ekvationen:

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_i) = m_{aq}^{des}(t_i) - \sum_{j=1}^{i=1} m_{aq}^{des}(j) \quad (14)$$

Den procentuella desorptionen

beräknas för tidpunkten t_i enligt ekvationen

▼B

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \qquad (15)$$

och för tidsintervallet (Δt_i) enligt ekvationen

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \qquad (16)$$

där:

D_{ti} = procentuell desorption vid tidpunkten t_i (%),

$D_{\Delta ti}$ = procentuell desorption under tidsintervallet Δt_i (%),

$m_{aq}^{des}(t_1)$ = massan av testämne som desorberats vid tidpunkten t_i (μg),

$m_{aq}^{des}(\Delta t_1)$ = massan av testämne som desorberats under tidsintervallet Δt_i (μg),

$m_m^{des}(t_i)$ = massan av testämne som uppmätts analytiskt vid tidpunkten t_i i den lösningsvolym V_r^i som har tagits för analysen (μg),

$m_{aq}{}^{A}$ = massan av testämne som blivit över från adsorptionsjämvikten på grund av ofullständig volymersättning (μg)

$$m_{aq}^{A} = m_{aq}^{ads}(eq) \cdot \left(\frac{V_0 - V_R}{V_0}\right) \qquad (17)$$

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = massan av testämne i lösningen vid adsorptionsjämvikt (μg),

V_R = volymen av supernatant som tagits ur röret efter uppnådd adsorptionsjämvikt och som ersatts med samma volym 0,01 M $CaCl_2$-lösning (cm^3),

V_r^i = volymen av lösning som tagits ur rör nummer i för uppmätning av testämnet i desorptionskinetiktestet (cm^3).

Desorptionsvärdena D_{ti} eller $D_{\Delta t_i}$(beroende på vad som krävs i undersökningen) ritas upp som funktion av tiden i ett diagram, och kurvan används för att bestämma när desorptionsjämvikt inträder.

b) **Seriemetoden**

I ekvationerna som följer är utgångspunkten att den föregående adsorptionsundersökningen utförts genom att mäta testämnet i små delprovsvolymer (v_a^A)av vattenfasen (seriemetoden, se avsnitt 1.9 ”Mätförfarande”). Härvid antas a) att volymen av den supernatant som avlägsnats ur röret efter adsorptionskinetiktestet har ersatts med en lika stor volym av 0,01 M $CaCl_2$-lösning (V_R) och b) att den totala volymen av vattenfasen som är i kontakt med jord (V_T) under desorptionskinetiktestet förblir konstant och ges av följande ekvation:

$$V_T = V_0 - \sum_{i=1}^{n} v_a^A(i) \qquad (18)$$

▼B

Vid tidpunkten t_i, gäller följande:

— Massan av testämne mäts i ett litet delprov ((v_a^D)) och den desorberade massan beräknas enligt följande ekvation:

$$m_{aq}^{des}(t_i) = m_m^{des}(t_i) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^A \cdot \left(\frac{\left(V_T - (i-1) \cdot v_a^D\right)}{V_T}\right) \quad (19)$$

— Vid desorptionsjämvikt är $t_i = t_{eq}$, och därför är $m_{aq}^{des}(t_i) = m_{aq}^{des}(eq)$

— Den procentuella desorptionen D_{t_i} beräknas enligt följande ekvation:

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \quad (20)$$

För tidsintervallet (Δt_i) gäller följande:

Mängden desorberat ämne beräknas för varje tidsintervall, enligt följande:

— för det första tidsintervallet $\Delta t_1 = t_1\text{-}t_0$

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_1) = m_m^{des}(t_1) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^A \text{ och } m_s^{des}(t_1) = m_s^{aq}(eq) - m_{aq}^{des}(\Delta t_1) \quad (21)$$

— för det andra $\Delta t_2 = t_2\text{-}t_1$

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_2) = m_m^{des}(t_2) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^{des}(\Delta t_1) \cdot \left(\frac{(V_T - v_a^D)}{V_T}\right) - m_{aq}^A \cdot \left(\frac{(V_T - v_a^D)}{V_T}\right) \quad (22)$$

och

$$m_s^{des}(t_2) = m_s^{ads}(eq) - \left[m_{aq}^{des}(\Delta t_1) + m_{aq}^{des}(\Delta t_2)\right]$$

— för det n:te tidsintervallet $\Delta t_n = t_n\text{-}t_{n-1}$

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_n) = \left[m_m^{des}(t_n) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^A \cdot \left(\frac{(V_T - (n-1) \cdot v_a^D)}{V_T}\right) - \sum_{i=1, n\neq 1}^{n-1} \left(\frac{(V_T - (n-i) \cdot v_a^D)}{V_T} \cdot m_{aq}^{des}(\Delta t_i)\right)\right] \quad (23)$$

och $m_s^{des}(t_n) = m_s^{ads}(eq) - \sum_{i=1, n\neq 1}^{n} m_{aq}^{des}(\Delta t_i)$

Till slut beräknas den procentuella desorptionen under varje tidsintervall $D_{\Delta t_i}$ med hjälp av ekvationen

$$D_{\Delta t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(\Delta t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \quad (24)$$

och den procentuella desorptionen D_{t_i} vid tidpunkten t_i ges av ekvationen

$$D_{t_i} = \frac{\sum_{j=\Delta t_i}^{\Delta t_i} m_{aq}^{des}(j)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100 = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \quad (25)$$

▼B

där de ovan använda parametrarna definieras på följande sätt:

$m_s^{des}(\Delta t_1)$, $m_s^{des}(\Delta t_2)$,... , $m_s^{des}(\Delta t_n)$ = massan av testämne som desorberas under tidsintervallen Δt_1, $\Delta\ t_2$,… Δt_n (μg),

$m_{aq}^{des}(\Delta t_1)$, $m_{aq}^{des}(\Delta t_2)$,... , $m_{aq}^{des}(\Delta t_n)$ = massan av testämne som desorberas under tidsintervallen Δt_1, Δt_2,..., Δt_n (μg);

$m_m^{des}(t_1)$, $m_m^{des}(t_2)$,... , $m_m^{des}(t_n)$ = = massan av ämne som uppmätts i ett delprov ($v^D{}_a$) vid tidpunkterna t_1,t_2,..., t_n (Hg).

V_T = totala volymen av vattenfas som är i kontakt med jorden under desorptionskinetiktestet enligt seriemetoden (cm^3),

$m^A{}_{aq}$ = massan av testämne som blivit över efter uppnådd adsorptionsjämvikt på grund av ofullständig volymersättning (μg),

$$m_{aq}^{A} = \left(\frac{\left(V_0 - \sum_{i=1}^{n} v_a^A(i) \right) - V_R}{\left(V_0 - \sum_{i=1}^{n} v_a^A(i) \right)} \right) \cdot m_{aq}^{ads}(eq) \qquad (26)$$

V_R = volymen av supernatant som avlägsnats ur röret efter att adsorptionsjämvikt inträtt och som ersatts med samma volym av 0,01 M $CaCl_2$-lösning (cm^3)

v_a^D = volymen av det delprov som tagits för analys ur rör nummer i under desorptionskinetiktestet enligt seriemetoden (cm^3).

$$v_a^D \leq 0,02 \cdot V_T \qquad (27)$$

▼B

Bilaga 6

TEST AV ADSORPTION OCH DESORPTION I JORDAR – RAPPORTBLANKETTER

Testämne:

Jord:

Jordens torrhalt (105 °C, 12 h): ..... %

Temperatur: ..... °C

Analysmetodens lämplighet

Uppvägt jordprov	g	
Jordens torrmassa	g	
$CaCl_2$-lösningens volym	cm^3	
Slutlösningens nominella koncentration	µg cm^{-3}	
Slutlösningens analyserade koncentration	µg cm^{-3}	

Princip för den använda analysmetoden:

Kalibrering av analysmetoden:

Testämne:

Jord:

Jordens torrhalt (105 °C, 12 h): ..... %

Temperatur: ..... °C

Analysmetod: Indirekt metod ☐ Parallellmetod ☐ Seriemetod ☐ Direkt metod ☐

Adsorptionstest: testprover

	Beteckning	Måttenhet	Jämviktstid		Jämviktstid		Jämviktstid		Jämviktstid	
Rör nr										
Uppvägt jordprov	—	g								
Jordens torrmassa	m_{jord}	g								
Uppvägda jordprovets vattenvolym (beräknat värde)	V_{WS}	cm^3								
Volym av 0,01 M $CaCl_2$-lösning för att få jorden i jämvikt		cm^3								
Stamlösningens volym		cm^3								
Totalvolym av vattenfas i kontakt med jord	V_0	cm^{-3}								
Testlösningens ursprungliga koncentration	C_0	µg cm^{-3}								
Testämnets massa vid testets början	m_0	µg								

▼B

	Beteckning	Måtten-het	Jämviktstid		Jämviktstid		Jämviktstid		Jämviktstid	
Efter omröring och centrifugering										
INDIREKT METOD										
Parallellmetod										
Testämnets koncentration i vattenfasen (med blindprovskorrigering)	$C_{aq}^{ads}(t_i)$	µg cm^{-3}								
Seriemetod										
Massan av testämne som uppmätts i delprovet V^{A}_{a}	$m_m^{ads}(t_i)$	µg								
DIREKT METOD										
Massan av testämne som adsorberats i jord	$m_s^{ads}(t_i)$	µg								
Beräkning av adsorptionen										
Adsorption	A_{t_i}	%								
	$A_{\Delta t_i}$	%								
Medelvärde										
Adsorptionskoefficient	K_d	$cm^3 g^{-1}$								
Medelvärde										
Adsorptionskoefficient	K_{OC}	$cm^3\ g^{-1}$								
Medelvärde										

Testämne:

Jord:

Jordens torrhalt (105 °C, 12 h): ..... %

Temperatur: ..... °C

Adsorptionstest: blind- och kontrollprov

	Beteckning	Måttenhet	Blindprov		Blindprov		Kontrollprov	
Rör nr								
Uppvägt jordprov		g					0	0
Uppvägda jordprovets vattenvolym (beräknat värde)		cm^3					—	—
Tillsatt volym av 0,01 M $CaCl_2$-lösning		cm^3						
Tillsatt volym av testämnets stamlösning		cm^3	0	0				
Vattenfasens totalvolym (beräknat värde)		cm^3					—	—

▼B

	Beteckning	Måttenhet	Blindprov		Blindprov		Kontrollprov	
Testämnets ursprungliga koncentration i vattenfasen		µg cm^{-3}						

Efter omröring och centrifugering

Koncentration i vattenfasen		µg cm^{-3}						

Anm.: Lägg till kolumner efter behov.

Testämne:

Jord:

Jordens torrhalt (105 °C, 12 h): ..... %

Temperatur: ..... °C

Massbalans

	Beteckning	Måttenhet				
Rör nr						
Uppvägt jordprov	—	g				
Jordens torrmassa	m_{soil}	g				
Uppvägda jordprovets vattenvolym (beräknat värde)	V_{WS}	ml				
Volym av 0,01 M $CaCl_2$-lösning för att få jorden i jämvikt		ml				
Stamlösningens volym		cm^3				
Total volym av vattenfas i kontakt med jord	V_0	cm^3				
Testlösningens ursprungliga koncentration	C_0	µg cm^{-3}				
Jämviktstid	—	h				
Efter omröring och centrifugering						
Testämnets koncentration i vattenfasen (med blindprovskorrigering)	$C_{aq}^{ads}(eq)$	µg cm^{-3}				
Jämviktstid	t_{eq}	h				
l:a utspädning med lösningsmedel						
Avlägsnad volym av vattenfas	V_{rec}	cm^3				
Tillsatt volym av lösningsmedel	ΔV	cm^3				
l:a extraktion med lösningsmedel						
Signalutslag vid analys av lösningsmedlet	S_{E1}	varierande				
Testämnets koncentration i lösningsmedlet	C_{E1}	µg cm^{-3}				

▼B

	Beteckning	Måttenhet				
Massan av ämne som extraherats från jord och kärlets väggar	m_{E1}	µg				
2:a utspädning med lösningsmedel						
Avlägsnad volym av lösningsmedel	ΔV_s	cm^3				
Tillsatt volym av lösningsmedel	AV	cm^3				
2:a extraktion med lösningsmedel						
Signalutslag vid analys av lösningsmedlet	S_{E2}	varierande				
Testämnets koncentration i lösningsmedlet	C_{E2}	µg cm^{-3}				
Massan av testämne som extraherats från jord och kärlets väggar	m_{E2}	µg				
Total massa av testämne som extraherats i två steg	M_E	Mg				
Massbalans	MB	%				

Testämne:

Jord:

Jordens torrhalt (105 °C, 12 h): ..... %

Temperatur: ..... °C

Adsorptionsisotermer

	Beteckning	Måtten-het								
Rör nr										
Uppvägt jordprov	—	g								
Jordens torrmassa	E	g								
Uppvägda jordprovets vattenvolym (beräknat värde)	V_{WS}	cm^3								
Volym av 0,01 M $CaCl_2$-lösning för att få jorden i jämvikt		cm^3								
Volym av tillsatt stamlösning		cm^3								
Total volym av vattenfas i kontakt med jord (beräknat värde	V_0	cm^3								
Lösningens koncentration	C_0	µg cm^{-3}								
Jämviktstid	—	h								

▼B

	Beteckning	Måtten-het								

Efter omröring och centrifiigering

Testämnets koncentration i vattenfasen (med blindprovskorrigering)	$C_{aq}^{ads}(eq)$	µg cm^{-3}								
Temperatur		°C								
Adsorberad massa per enhet ord	$C_s^{ads}(eq)$	µg g^{-1}								

Regressionsanalys:

värdet på K_F^{ads}:

värdet på l/n:

regressionskoefficient r^2:

Testämne:

Jord:

Jordens torrhalt (105 °C, 12 h): ..... %

Temperatur: ..... °C

Analysmetod: Indirekt metod ☐ Parallellmetod ☐ Seriemetod ☐

Desorptionstest

		Beteckning	Måtten-het	Tidsinter-vall	Tidsinter-vall	Tidsinter-vall	Tidsinter-vall
Numret på röret som kommer från adsorptionssteget							
Massan av testämne som adsorberats i jord vid adsorptionsjämvikt		$m_s^{ads}(eq)$	µg				
Avlägsnad volym av vattenfas, ersatt med 0,01 M $CaCl_2$		V_R	cm^3				
Total volym av vattenfas i kontakt med jord	PM	V_0	cm^3				
	SM	V_T	cm^3				
Massan av testämne som blivit över efter uppnådd adsorptionsjämvikt på grund av ofullständig volymersättning		m_{aq}^A	µg				
Desorptionskinetik							
Uppmätt massa av testämne som desorberats ur jorden vid tidpunkten t_i		$m_m^{des}(t_i)$	µg				
Volym av lösning som tagits ur rör nummer i för uppmätning av testämnet	PM	V_f^i	cm^3				
	SM	v_a^D	cm^3				
Massan av testämne som desorberats ur jorden vid tiden t_i (beräknat värde)		$m_{aq}^{des}(t_i)$	µg				
Massan av testämne som desorberats ur jorden under tidsintervallet Δt_i (beräknat värde)		$m_{aq}^{des}(\Delta t_i)$	µg				

▼B

	Beteckning	Måtten-het	Tidsinter-vall	Tidsinter-vall	Tidsinter-vall	Tidsinter-vall
Procentuell desorption						
Desorption vid tidpunkten t_i	D_{ti}	%				
Desorption under tidsintervallet Δt_i	$D_{\Delta t_i}$	%				
Skenbar desorptionskoefficient	K_{des}					

PM: Parallellmetod

SM: Seriemetod

▼B

C.19 UPPSKATTNING AV ADSORPTIONSKOEFFICIENTEN (K_{OC}) I JORD OCH AVLOPPSSLAM MED ANVÄNDNING AV HÖGTRYCKSVÄTSKEKROMATOGRAFI (HPLC)

1. METOD

Denna metod är i stort sett identisk med OECD TG121 (2001).

1.1 INLEDNING

Sorptionsbeteendet hos ämnen i jord eller avloppsslam kan beskrivas med hjälp av parametrar som bestämts på experimentell väg med testmetod C.18. En viktig parameter är adsorptionskoefficienten. Den definieras som förhållandet mellan ämnets koncentration i jorden/slammet och ämnets koncentration i vattenfasen vid adsorptionsjämvikt. En adsorptionskoefficient som är normaliserad till jordens halt av organiskt bundet kol (K_{OC}) är en värdefull indikator på en kemikalies bindningsförmåga till det organiska materialet i jord och avloppsslam och ger möjlighet att jämföra olika kemikalier. Denna parameter kan uppskattas genom korrelationer med vattenlösligheten och fördelningskoefficienten n-oktanol/vatten (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7).

Vid den försöksmetod som beskrivs här används HPLC för uppskattning av adsorptionskoefficienten K_{OC} i jord och avloppsslam (8). Dessa uppskattningar är tillförlitligare än resultaten från QSAR-beräkningar (9). En uppskattningsmetod kan aldrig helt ersätta mätningar vid jämvikt i uppslammat prov (testmetod C.18). Det uppskattade värdet på K_{OC} kan dock användas som stöd vid valet av lämpliga testparametrar för adsorptions-/desorptionsundersökningar enligt testmetod C.l8, genom beräkning av K_d (distributionskoefficient) eller K_f (Freundlich-adsorptionskoefficient) enligt ekvation 3 (se avsnitt 1.2).

1.2 DEFINITIONER

K_d: Distributionskoefficienten definieras som förhållandet mellan jämviktkoncentrationerna C för ett upplöst testämne i ett tvåfassystem som består av sorbent (jord eller avloppsslam) och en vattenfas. Förhållandet har ingen måttenhet när koncentrationerna i båda faserna uttrycks som vikt per vikt. Om koncentrationen i vattenfasen ges som vikt per volym blir måttenheten ml-g^{-1}. K_d kan variera beroende på sorbentens egenskaper och kan vara koncentrationsberoende.

$$K_d = \frac{C_{jord}}{C_{vatten}} \; or \; \frac{C_{slam}}{C_{vatten}} \qquad (1)$$

där:

C_{jord} = testämnets koncentration i jord vid jämvikt (µg· g^{-1})

C_{slam} = testämnets koncentration i slam vid jämvikt (µg· g^{-1})

C_{vatten} = testämnets koncentration i vattenfasen vid jämvikt (ug· g^{-1}, µg· ml^{-1})

▼B

K_f: Freundlich-adsorptionskoefficienten definieras som testämnets koncentration i jord eller avloppsslam (x/m) när jämviktskoncentrationen C_{vatten} i vattenfasen har värdet ett. Måttenheten är μg· g^{-1} sorbent. Värdet kan variera beroende på sorbentens egenskaper.

$$\log \frac{x}{m} = \log K_f + \frac{1}{n} \cdot \log C_{vatten} \quad (2)$$

där:

x/m = mängden testämne x (μg) som adsorberats på mängden sorbent m (g) vid jämvikt

l/n = lutningen hos Freundlich-adsorptionsisotermen

C_{vatten} = testämnets koncentration i vattenfasen vid jämvikt (μg· ml^{-1})

$$\text{At} C_{vatten} = 1; \log K_f = \log \frac{x}{m}$$

K_{oc}: Distributionskoefficienten (K_d) eller Freundlich-adsorptionskoefficienten (K_f) normaliserad till sorbentens halt av organiskt kol (f_{oc}). Särskilt för icke-joniserade kemikalier utgör den en ungefärlig indikator på omfattningen av adsorption mellan ett ämne och sorbenten och ger möjlighet att göra jämförelser mellan olika kemikalier. Beroende på måttenheterna för K_d och K_f kan K_{oc} sakna måttenhet eller ha måttenheten ml g^{-1} eller μg· g^{-1} organiskt material.

$$\text{Koc} = \frac{\text{Kd}}{\text{foc}} \text{ (utan måttenhet eller ml} \cdot g^{-1}) \text{ eller } \frac{\text{Kf}}{\text{foc}} (\mu g \cdot g^{-1}) \quad (3)$$

Förhållandet mellan K_{OC} och K_d är inte alltid linjärt och därför kan K_{oc}-värdena variera mellan olika typer av jord men värdenas variabilitet är betydligt mindre jämfört med K_d- eller K_f-värden.

Adsorptionskoefficienten (K_{oc}) härleds från kapacitetsfaktorn (k') med användning av en kalibreringskurva log k' mot log K_{oc} för valda referensföreningar.

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (4)$$

där:

t_R = HPLC retentionstiden för test- och referensämne (minuter)

t_0 = HPLC dödtid (minuter) (se avsnitt 1.8.2)

P_{ow}: Fördelningskoefficienten oktanol-vatten definieras som förhållandet mellan koncentrationerna för upplösta ämnen i n-oktanol och vatten. Värdet har ingen måttenhet.

$$\text{Pow} = \frac{\text{Coktanol}}{\text{Cvatten}} (= \text{Kow}) \quad (5)$$

1.3 REFERENSÄMNEN

Strukturformeln, renheten och dissociationskonstanten (i tillämpliga fall) bör vara kända innan metoden används. Helst ska man också ha tillgång till information om lösligheten i vatten och organiska lösningsmedel, fördelningskoefficienten oktanol-vatten och hydrolysegenskaperna.

▼B

För att korrelera uppmätta HPLC-retentionsdata för ett testämne med ämnets adsorptionskoefficient K_{oc} behövs en kalibreringskurva för log K_{oc}. mot log k'. För kurvan krävs minst sex referenspunkter, av vilka minst en ligger ovanför och en under det förväntade värdet för testämnet. Metodens resultat blir betydligt mer exakt om man använder referensämnen som är strukturellt besläktade med testämnet. Om sådana data inte finns tillgängliga ligger valet av lämpliga kalibreringsämnen hos användaren. Då bör en mer allmän uppsättning av strukturellt heterogena ämnen väljas. I tabell 1 i bilagan görs en uppräkning av ämnen och K_{oc}-värden som kan användas för avloppsslam och i tabell 3 ges motsvarande uppgifter för jord. Om andra kalibreringsämnen används måste detta motiveras.

1.4 PRINCIP FÖR TESTMETODEN

HPLC utförs med analytiska kolonner som är packade med kommersiellt tillgänglig stationär fas av cyanopropyl med lipofila och polära grupper. Den stationära fasen är måttligt polär och baserad på en silikamatris, enligt följande:

–O – Si	$–CH_2 – CH_2 – CH_2$	–CN
silika	icke-polär bulk	polär grupp

Principen för testmetoden är densamma som för testmetod A.8 (Fördelningskoefficient, HPLC-metod). När testämnet passerar genom kolonnen tillsammans med den rörliga fasen växelverkar testämnet med den stationära fasen. Testämnet fördelas mellan den rörliga och stationära fasen och bromsas därför upp. I och med den stationära fasens sammansättning med både polära och icke-polära bindningsställen kan en molekyls polära och icke-polära grupper växelverka på liknande sätt som när det gäller organiskt material i jord eller i avloppsslam. Det betyder att man kan bestämma förhållandet mellan retentionstiden i kolonnen och adsorptionskoefficienten i organiskt material.

pH-värdet har stor inverkan på sorptionsbeteendet, särskilt när det gäller polära ämnen. I jordbruksjord eller tankar i avloppsreningsverk varierar pH-värdet i regel mellan 5,5 och 7,5. För joniserbara ämnen bör man utföra två test i lämpliga buffertlösningar där det ena testet utförs med joniserad form och det andra med ickejoniserad form, men endast i fall där minst 10 % av testämnet dissocieras inom pH-intervallet 5,5–7,5.

Eftersom endast förhållandet mellan retentionen i HPLC-kolonnen och adsorptionskoefficient används för utvärderingen behövs ingen kvantitativ analytisk metod och endast retentionstiden behöver bestämmas. Om en lämplig uppsättning referensämnen och standardbetingelser kan användas för testet ger denna metod tillgång till ett snabbt och effektivt sätt för bestämning av adsorptionskoefficienten K_{oc}.

1.5 TESTETS TILLÄMPBARHET

HPLC-metoden kan användas på kemiska ämnen (märkta eller omärkta) för vilka det finns tillgång till ett lämpligt detektionssystem (t.ex. spektrofotometer, radioaktivitetsdetektor) och som är tillräckligt stabila under den tid testet varar. Testet kan vara särskilt användbart för kemikalier som är svåra att undersöka i andra försökssystem (t.ex. flyktiga ämnen, ämnen som inte är lösliga i vatten vid koncentrationer som kan mätas analytiskt, ämnen med en hög affinitet till ytan i inkubationssystem). Metoden kan användas för blandningar som ger olösta elutionsband. I sådana fall bör man ange log K_{oc}-värdenas övre och undre gränser för testblandningens föreningar.

▼B

Orenheter kan i bland leda till problem vid tolkningen av HPLC-resultaten, men orenheterna har inte så stor betydelse så länge som testämnet klart kan identifieras analytiskt och separeras från orenheterna.

Metoden är validerad för de ämnen som räknas upp i tabell 1 i bilagan och metoden har också tillämpats på ett antal andra kemikalier i följande kemikalieklasser:

— Aromatiska aminer (t.ex. trifluralin, 4-kloranilin, 3,5-dinitroanilin, 4-metylanilin, N-metylanilin, 1-naftylamin).

— Estrar av aromatiska karboxylsyror (t.ex. bensoesyrametylester, 3,5-dinitrobensoesyraetylester).

— Aromatiska kolväten (t.ex. toluen, xylen, etylbensen, nitrobensen).

— Aryloxifenoxipropionsyraestrar (t.ex. diklofop-metyl, fenoxaprop-etyl, fenoxaprop-P-etyl).

— Bensimidazol- och imidazol-fungicider (t.ex. karbendazim, fuberidazol, triazoxid).

— Karboxylsyraamider (t.ex. 2-klorbensamid, N,N-dimetylbcnsamid, 3,5-dinitrobensamid, N-metylbensamid, 2-nitrobensamid, 3-nitrobensamid).

— Klorerade kolväten (t.ex. endosulfan, DDT, hexaklorbensen, quintozen, 1,2,3-triklorbensen).

— Bekämpningsmedel typ organiska fosforföreningar (t.ex. azinfos-metyl, disulfoton, fenamifos, isofenfos, pyrazofos, sulprofos, triazofos).

— Fenoler (t.ex. fenol, 2-nitrofenol, 4-nitrofenol, pentaklorofenol, 2,4,6-triklorfenol, 1-naftol).

— Fenylurcaderivat (t.e.x. isoproturon, monolmuron, pencycuron).

— Pigmentfärgämnen (t.ex. Acid Yellow 219, Basic Blue 41, Direct Red 81).

— Polyaromatiska kolväten (t.ex. acenaften, naftalen).

— 1,3,5-triazin-herbicider (t.ex. prometryn, propazin, simazin, terbutryn).

— Triazolderivat (t.ex. tebukonazol, triadimefon, tradimenol, triapentenol).

Metoden kan inte tillämpas på ämnen som reagerar med eluenten eller den stationära fasen. Metoden är heller inte tillämplig på ämnen som har specifik växelverkan med oorganiska komponenter (t.ex. genom bildning av klusterkomplex med lermineraler). Metoden fungerar eventuellt inte för ytaktiva ämnen, oorganiska föreningar och måttliga eller starka organiska syror och baser. Log K_{oc}-värden från 1,5 till 5,0 kan bestämmas. Joniserbara ämnen måste mätas med hjälp av en buffrad rörlig fas, men stor vikt måste fästas vid att undvika utfällning av buffertkomponenter eller testämne.

▼B

1.6 KVALITETSKRITERIER

1.6.1 **Noggrannhet**

I regel kan adsorptionskoefficient för ett testämne bestämmas inom ±0,5 logaritmiska enheter av det värde som kan bestämmas med mätningar vid jämvikt i uppslammat prov (se tabell 1 i bilagan). Noggrannheten förbättras om det finns tillgång till referensämnen som är strukturellt besläktade med testämnet.

1.6.2 **Repeterbarhet**

Bestämningarna bör köras minst två gånger. De log K_{oc}-värden som härletts från individuella mätningar bör ligga inom ett område på 0,25 logaritmiska enheter.

1.6.3 **Reproducerbarhet**

De erfarenheter man hittills har från metoden ger belägg för metodens validitet. En undersökning av HPLC-metoden med 48 ämnen (i huvudsak bekämpningsämnen) för vilka det fanns tillgång till tillförlitliga data om K_{oc} i jord gav en korrelationskoefficient på R = 0,95 (10) (11).

Ett jämförelsetest utfördes av elva deltagande laboratorier för att förbättra och validera metoden (12). Resultaten anges i tabell 2 i bilagan.

1.7 BESKRIVNING AV TESTMETODEN

1.7.1 **Preliminär uppskattning av adsorptionskoefficienten**

Fördelningskoefficienten oktanol-vatten P_{ow} (= K_{ow}) och, i viss utsträckning, vattenlösligheten kan användas som indikatorer för adsorptionens omfattning, särskilt för icke-joniserande ämnen. Det betyder att dessa indikatorer kan användas för preliminära orienterande test. Korrelationer för flera grupper av kemikalier finns angivna i ett antal publikationer (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7).

1.7.2 **Apparatur**

För testet krävs en vätskekromatograf försedd med en pulsfri pump och lämplig detekteringsutrustning. Det är tillrådligt att använda en injektionsventil med en injektionsslinga. Kolonnen ska vara packad med kommersiellt tillgängligt kemiskt bundet cyanopropylharts på silikabas (t.ex. Hypersil och Zorbax CN). En guardkolonn av samma material kan placeras mellan injektionssystemet och analyskolonnen. Kolonner från olika tillverkare kan vara mycket olika när det gäller separationseffektivitet. Som riktvärden för den kapacitetsfaktor k' som bör uppnås gäller följande: log k' > 0,0 för log K_{oc} = 3,0 och log k' > 0,4 för log K_{oc} = 2,0 när man använder metanol/vatten 55/45 % som rörlig fas.

1.7.3 **Rörlig fas**

Flera olika rörliga faser har testats och följande två rekommenderas:

— metanol/vatten (55/45 % v/v)

— methanol/0,01 M citratbuffert pH 6,0 (55/45 % v/v).

▼B

För beredning av det eluerande lösningsmedlet används HPLC-klassificerad metanol och destillerat vatten eller citratbuffert. Blandningen avgasas före användningen. Isokratisk eluering bör användas. Om blandningar av metanol och vatten inte är lämpliga kan man försöka med andra blandningar av organiskt lösningsmedel och vatten, t.ex. etanol och vatten eller acetonitril och vatten. För joniserbara blandningar rekommenderas användning av buffertlösningar för stabilisering av pH. Stor vikt måste fästas vid att undvika saltutfällning och kolonnförsämring, vilket kan inträffa med vissa blandningar av organisk fas/buffert.

Inga tillsatser av typen jonparsreagenser bör användas, eftersom de kan påverka den stationära fasens sorptionsegenskaper. Sådana ändringar i den stationära fasen kan i vissa fall vara irreversibla. Därför måste alla försök där tillsatser används utföras med separata kolonner.

1.7.4 **Upplösta ämnen**

Test- och referensämnen upplöses i den rörliga fasen.

1.8 TESTETS UTFÖRANDE

1.8.1 **Testbetingelser**

Temperaturen under matningarna bör registreras. Det är högst tillrådligt att hålla kolonnen i temperaturkontrollerad miljö för att garantera konstanta betingelser under kalibrerings- och bestämningskörningarna och vid mätning av testämnet.

1.8.2 **Bestämning av dödtiden t_0**

För bestämning av dödtiden t_0 kan två olika metoder användas (se även avsnitt 1.2).

1.8.2.1 *Bestämning av dödtiden t_0 med användning av en homolog serie*

Detta förfarande har visat sig ge tillförlitliga och standardiserade värden på t_0. Närmare uppgifter finns i testmetod A.8 (Fördelningskoefficient (n-oktanol/vatten), HPLC-metoden).

1.8.2.2 *Bestämning av dödtiden t_0 med användning av inerta ämnen som inte bromsas upp i kolonnen*

Denna teknik baserar sig på injicering av lösningar av formamid, urea eller natriumnitrat. Mätningarna bör utföras minst två gånger.

1.8.3 **Bestämning av retentionstiderna t_R**

Referensämnena bör väljas enligt beskrivningen i avsnitt 1.3. Vid bestämning av retentionstiderna kan de injiceras som en blandad standard, förutsatt att det finns belägg för att retentionstiden för varje referensstandard inte påverkas av närvaron av de andra referensstandarderna. Kalibreringen bör utföras med regelbundna intervall minst två gånger dagligen så att man kan beakta inverkan av oväntade förändringar i kolonnens prestanda. Det bästa förfarandet är att göra injektionerna före och efter injektionerna av testämnet, för att bekräfta att retentionstiderna inte har förskjutits. Testämnena injiceras i så små mängder som möjligt (för att undvika överbelastning på kolonnen) och deras retentionstider bestäms.

▼B

Bestämningarna bör göras minst dubbelt för att öka mätningarnas tillförlitlighet. De värden på log K_{oc} som härletts från individuella mätningar bör falla inom ett område på 0,25 logaritmiska enheter.

1.8.4 **Utvärdering**

Kapacitetsfaktorerna k' beräknas utifrån dödtiden t_0 och retentionstiderna t_R hos de valda referensämnena enligt ekvation 4 (se avsnitt 1.2). Referensämnenas värden på log k' plottas sedan mot deras värden på log K_{oc} från mätningar vid jämvikt i uppslammat prov (se tabellerna 1 och 3 i bilagan). Med hjälp av den erhållna kurvan kan log k'-värdet för ett testämne därefter användas för att bestämma ämnets log K_{oc}-värde. Om de aktuella resultaten visar att log K_{oc} för testämnet ligger utanför kalibreringsområdet måste testet upprepas med användning av andra, lämpligare referensämnen.

2. **DATA OCH RAPPORTERING**

Rapporten måste innehålla följande uppgifter:

— Identifiering av test- och referensämnen och deras renhet samt, om det är relevant, pK_a-värden.

— Beskrivning av utrustningen och testbetingelserna, t.ex. analyskolonnens (och guardkolonnens) typ och mått, detekteringsmetoden, den rörliga fasen (komponenternas förhållande, pH), temperaturområdet under matningarna.

— Dödtid och den metod som har använts för att bestämma den.

— Mängderna test- och referensämnen som har tillförts kolonnen.

— Retentionstiderna för de referensämnen som har använts för kalibrering.

— Närmare uppgifter om den anpassade regressionslinjen (log k' mot log K_{oc}) och en grafisk framställning av regressionslinjen.

— Medelvärden för retentionsdata och uppskattat log K_{oc}-värde för testämnet.

— Kromatogram.

3. **HÄNVISNINGAR**

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, s. 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., 17, s. 227–231.

5. Z. Gerstl, U. Mingelgrin (1984), Sorption of organic substances by soils and sediment. J. Environm. Sci. Health, B19, s. 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, s. 831–832.

7. S. W. Karickhoff (1981), Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils. Chemosphere, 10, s. 833–846.

8. 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), s. 121–128.

9. M. Mueller, W. Kördel (1996), Comparison of screening methods for the estimation of adsorption coefficients on soil. Chemosphere, 32(12), s. 2493–2504.

10. W. Kördel, 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), s. 2341–2352.

11. B. von Oepen, W. Kördel, 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, s. 285–304.

12. W. Kördel, G. Kotthoff, J. Müller (1995), HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil-results of a ring test. Chemosphere, 30(7), s. 1373–1384.

▼B

Bilaga

Tabell 1

Jämförelse av K_{oc}-värden för jord och avloppsslam och beräknade värden från HPLC-screeningmetoden ([1]), ([2])

Ämne	CAS-nr	log K_{oc} avlopps-slam	log K_{oc} HPLC	A	log K_{oc} jord	HPLC	A
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
Fention	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
Fenantren	85-01-8	4,35	3,72	0,63	4,09	3,52	0,57
Bensoesyrafenyles-ter	93-99-2	3,26	3,03	0,23	2,87	2,94	0,07
Bensamid	55-21-0	1,60	1,00	0,60	1,26	1,25	0,01
4-nitrobensamid	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-dikloranilin	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), 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), 107 — 119.

Tabell 2

Resultat av jämförelsetest mellan laboratorier (11 deltagande laboratorier) som har utförts för att förbättra och validera HPLC-metoden ([1])

Ämne	CAS-nr	log K_{oc}	K_{oc}	Log K_{oc}
		(OECD 106)	(HPLC-metodcn)	
Atrazin	1912-24-9	1,81	78 ± 16	1,89
Monuron	150-68-5	1,99	100 ± 8	2,00
Triapentenol	77608-88-3	2,37	292 ± 58	2,47
Linuron	330-55-2	2,59	465 ± 62	2,67
Fention	55-38-9	3,31	2062 ± 648	3,31

([1]) W. Kördel, G. Kotthoff, J. Müller (1995). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil-results of a ring test. Chemosphere, 30(7), 1373-1384.

▼B

Tabell 3

Rekommenderade referensämnen för HPLC-screeningmetoden på grundval av jordadsorptionsdata

Referensamne	CAS-nr	Log K_{oc}-medelvärden från matningar vid jamvikt i uppslammat prov	antal K_{oc}-data	Log S.D.	Källa
Acetanilid	103-84-4	1,25	4	0,48	[a]
Fenol	108-95-2	1,32	4	0,70	[a]
2-nitrobensamid	610-15-1	1,45	3	0,90	[b]
N, N-dimetylbensamid	611-74-5	1,52	2	0,45	[a]
4-metylbensamid	619-55-6	1,78	3	1,76	[a]
Metylbensoat	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-nitrobensamid	645-09-0	1,95	3	1,31	[b]
Anilin	62-53-3	2,07	4	1,73	[a]
3,5-dinitrobensamid	121-81-3	2,31	3	1,27	[b]
Karbendazim	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]
Triazofos	24017-47-8	2,55	3	1,78	[c]
Linuron	330-55-2	2,59	3	1,97	[c]
Naftalen	91-20-3	2,75	4	2,20	[a]
Endosulfandiol	2157-19-9	3,02	5	2,29	[c]
Metiokarb	2032-65-7	3,10	4	2,39	[c]
Acid Yellow 219	63405-85-6	3,16	4	2,83	[a]
1,2,3-triklorbensen	87-61-6	3,16	4	1,40	[a]
γ-HCH	58-89-9	3,23	5	2,94	[a]
Fention	55-38-9	3,31	3	2,49	[c]
Direct Red 81	2610-11-9	3,43	4	2,68	[a]
Pyrazofos	13457-18-6	3,65	3	2,70	[c]
a-endosulfan	959-98-8	4,09	5	3,74	[c]
Diklofop-metyl	51338-27-3	4,20	3	3,77	[c]
benantren	85-01-8	4,09	4	3,83	[a]
Basic Blue 41 (blandning)	26850-47-5 12270-13-2	4,89	4	4,46	[a]
DDT	50-29-3	5,63		—	[b]

[a] W. Kördel, J. Müller (1994), Bestimmung des Adsorplionskoeffizienten organischer Chemikalien mit der HPLC, UBA R & D Report No. 106 01044 (1994).
[b] B.V. Oepen, \V. Kördel, W. Klein. (1991). Chemosphere, 22, s. 285–304.
[c] (C) Data från industrin.

▼M7

C.20 REPRODUKTIONSTEST PÅ *DAPHNIA MAGNA*

INLEDNING

Denna testmetod motsvarar OECD:s testriktlinje (TG) 211 (2012). OECD:s testriktlinjer utvärderas med jämna mellanrum som en anpassning till den vetenskapliga utvecklingen. Testriktlinje 211 om reproduktionstestet härrör från testriktlinje 202, del II, Reproduktionstest på *Daphnia* sp. (1984). Det är allmänt vedertaget att data från tester som utförs enligt TG 202 kan vara variabla. Därför har ett omfattande arbete utförts för att identifiera skälen till denna variabilitet, med målet att ta fram en bättre testmetod. Testriktlinje 211 baseras på resultatet av forskning, provningsjämförelser och valideringsundersökningar som utfördes 1992 (1), 1994 (2) och 2008 (3).

De viktigaste skillnaderna mellan den ursprungliga versionen (TG 202, 1984), och den andra versionen (TG 211, 1998) är följande:

— Den rekommenderade art som ska användas är *Daphnia magna*.

— Testperiodens längd är 21 dagar.

— För semistatiska test har det antal djur som ska användas för varje testkoncentration minskats från minst 40, helst indelade i fyra grupper med tio djur, till minst tio djur som hålls individuellt (även om en annan utformning kan användas för genomflödestest).

— Rekommendationerna om testmedium och utfodringsförhållanden har gjorts mer detaljerade.

— De viktigaste skillnaderna mellan den andra versionen av testriktlinjen för reproduktionstest (TG 211, 1998) och denna version är följande:

— En beskrivning av förfaranden för identifiering av kön för nyfödda djur har lagts till i form av tillägg 7. Enligt de tidigare versionerna av denna testmetod är kön en valfri endpoint.

— Responsvariabeln antal levande avkomma producerade per överlevande föräldradjur har kompletteras med en ytterligare responsvariabel för reproduktion av *Daphnia*, dvs. totalt antal producerade levande avkomma i slutet av testet per föräldradjur i början av testet. Föräldradjur som dött oavsiktligt utesluts. Syftet med denna extra responsvariabel är att koppla den till andra reproduktionstestmetoder med ryggradslösa djur. Med hjälp av den nya responsvariabeln är det i denna testmetod dessutom möjligt att undanröja en felkälla, nämligen effekten av oavsiktliga dödsfall bland föräldradjur om sådana skulle ske under exponeringsperioden.

— Ytterligare statistisk vägledning för utformning av tester och behandling av resultat har inbegripits både för ECx (t.ex. EC_{10} eller EC_{50}) och för NOEC-/LOEC-metoden.

— Ett toleranstest införs.

De definitioner som används finns i tillägg 1.

TESTPRINCIP

Det primära syftet med detta test är att bedöma kemikaliers verkningar på reproduktionskapaciteten hos *Daphnia magna*. Unga honor av *Daphnia* (föräldragenerationen) som är yngre än 24 timmar vid testets början exponeras för testkemikalien som tillsätts vatten i en serie koncentrationer. Testperiodens längd är 21 dagar. I slutet av testet bedöms totalt antal producerad levande avkomma. Föräldragenerationens reproduktionskapacitet kan uttryckas på andra sätt (t.ex. antalet levande avkomma som producerats per djur per dag från och med första

▼M7

dagen då avkomma observerades). Sådana andra sätt måste i förekommande fall rapporteras separat, utöver total antal levande avkomma vid testets slut. På grund av det semistatiska testets särskilda utformning jämfört med andra reproduktionstestmetoder med ryggradslösa djur är det också möjligt att räkna antalet levande avkommor som producerats av varje enskilt föräldradjur. Till skillnad från andra reproduktionstestmetoder med ryggradslösa djur är det möjligt att utesluta avkommor från föräldradjur som dött oavsiktligt under testperioden från datautvärderingen. Om föräldradjur dör i de exponerade replikaten bör man därför överväga om dödligheten följer ett koncentrations-responsmönster eller ej, t.ex. om det finns en signifikant regression i responsen jämfört med testkemikaliens koncentration med en positiv kurva (här kan ett statistiskt test som Cochran-Armitages trendtest användas). Om dödligheten inte följer koncentrationsresponsens mönster bör replikat med dödlighet bland föräldradjuren undantas från analysen av testresultatet. Om dödligheten följer ett koncentrations-responsmönster bör föräldradjurens dödlighet anses utgöra en effekt av testkemikalien och replikaten bör inte undantas från analysen. Om föräldradjur dör oavsiktligt under testet, t.ex. på grund av misskötsel eller olycka eller på grund av en oförklarlig incident som inte är relaterad till testkemikalien eller visar sig vara av hankön, undantas replikatet från analysen (mer information lämnas i punkt 51). Testkemikaliens toxiska effekter på reproduktionskapaciteten uttrycks som ECx genom att man passar in data in en lämplig modell genom icke-linjär regression för att uppskatta den koncentration som skulle orsaka x % minskning av reproduktionsförmågan, eller alternativt som NOEC/LOEC-värdet (4). *Testkoncentrationerna ska helst ligga innanför den lägsta av de använda effektkoncentrationerna (t.ex. EC_{10}), vilket innebär att detta värde beräknas genom interpolering, inte extrapolering.*

Föräldragenerationens överlevnad och tiden fram till produktion av den första satsen avkomma bör också rapporteras. Övriga kemikalierelaterade verkningar på parametrar såsom tillväxt (t.ex. längd) och eventuellt inneboende tillväxthastighet hos populationen kan också undersökas (se punkt 44).

INFORMATION OM TESTKEMIKALIEN

Resultat av en akut toxicitetstest (se kapitel C.2 i denna bilaga: Test av akut immobilisering av *Daphnia*-arter utfört med *Daphnia magna* kan vara användbart för att välja en lämplig grad av testkoncentrationen i reproduktionstesterna. Testkemikaliens vattenlöslighet och ångtryck ska vara kända och en tillförlitlig analysmetod ska finnas tillgänglig för kvantifiering av kemikalien i testlösningen, med rapporterad återvinningseffektivitet samt analysgräns.

Användbar information för att definiera testbetingelserna är t.ex. testkemikaliens strukturformel, kemikaliens renhet, stabilitet i ljus, stabilitet i testförhållandena, pKa, P_{ow} och resultaten från test avseende biologisk lättnedbrytbarhet (se kapitel C.4 (bestämning av biologisk lättnedbrytbarhet) och C.29 (biologisk lättnedbrytbarhet – CO_2 i förslutna kärl) i denna bilaga.

TESTETS GILTIGHET

För att ett test ska vara giltigt måste följande kriterier uppfyllas för kontrollgruppen (kontrollgrupperna):

— Föräldragenerationens mortalitet (honor av *Daphnia*) får inte överskrida 20 % vid testets slut.

— Det genomsnittliga antalet levande avkommor som har producerats per föräldradjur och som lever vid testets slut måste vara $\geq$ 60.

Obs: Samma giltighetskriterium (20 %) kan användas för oavsiktlig dödlighet bland föräldradjur i kontrollerna samt för varje testkoncentration.

▼M7

BESKRIVNING AV TESTMETODEN

Utrustning

Testkärl och annan apparatur som kommer i kontakt med testämnet bör vara tillverkade uteslutande av glas eller annat kemiskt inert material. I regel används glasbägare.

Dessutom behövs åtminstone en del av följande utrustning:

— Syrgasmätare (med mikroelektrod eller annan lämplig anordning för mätning av löst syrgas i lågvolymsprover).

— Utrustning för temperaturreglering.

— pH-mätare.

— Utrustning för bestämning av vattnets hårdhetsgrad.

— Utrustning för bestämning av totalt organiskt kol (TOC) i vattnet eller utrustning för bestämning av kemisk syreförbrukning (COD).

— Apparatur för reglering av belysningen och mätning av ljusets intensitet.

Testorganism

Testet utförs på *Daphnia magna* Straus ([1]).

Klonen ska helst identifieras med hjälp av genotypbestämning. Forskningsresultat (1) har visat att reproduktionskapaciteten hos klon A (som härrör från IRCHA i Frankrike) (5) genomgående uppfyller giltighetskriteriet som gäller ett genomsnitt på > 60 överlevande avkommor per föräldradjur vid odling i de betingelser som beskrivs i denna testmetod. Andra kloner kan godtas förutsatt att *Daphnia*-odlingen kan påvisas uppfylla giltighetskriterierna för testet.

Vid testets början bör djuren vara yngre än 24 timmar och får inte tillhöra den första satsen avkomma. De ska komma från en frisk stam (dvs. inte visa tecken på stress, t.ex. hög dödlighet, förekomst av hanar och ephippier, fördröjd produktion av första kullen avkomma, missfärgade djur osv.). Stamdjuren bör hållas vid samma odlingsbetingelser (ljus, temperatur, medium, utfodring och djur per volymenhet) som används vid testet. Om annat än normalt odlingsmedium för *Daphnia* används vid testet är det tillrådligt med en acklimatiseringsperiod på i regel cirka tre veckor (dvs. en generation) innan testets inleds, för att undvika stress på föräldragenerationen.

Testmedium

För testet rekommenderas ett fullständigt definierat medium. Avsaknaden av tillsatser (t.ex. alger, jordextrakt) som är svåra att karakterisera möjliggör bättre standardisering mellan laboratorier. Elendt M4- (6) och M7-medier (se tillägg 2) har konstaterats vara lämpliga för ändamålet. Andra medier (t.ex. (7) och (8)) kan godtas förutsatt att det kan visas att utförandet av *Daphnia*-odlingen uppfyller giltighetskriterierna för testet.

([1]) Andra *Daphnia*-arter kan användas förutsatt att de uppfyller tillämpliga giltighetskriterier (giltighetskriteriet för reproduktionskapaciteten i kontrollgrupperna bör vara relevant för *alla* arter). Om andra arter av *Daphnia* används ska de identifieras ordentligt och det ska motiveras varför de används.

▼M7

Vid användning av medier som innehåller icke definierade tillsatser ska dessa tillsatser klart specificeras och uppgifter om deras sammansättning lämnas i testrapporten. Det är särskilt viktigt att ange kolhalten, eftersom kol kan utgöra ett fodertillskott. Det rekommenderas att totalt organiskt kol (TOC) och/eller kemisk syreförbrukning (COD) bestäms i en stamberedning av den organiska tillsatsen och att en uppskattning görs av hur denna påverkar TOC/COD i testmediet. TOC-nivån i mediet (dvs. före tillsats av algerna) bör dessutom vara lägre än 2 mg/l (9).

Vid testning av kemikalier som innehåller metaller är det viktigt att beakta det faktum att testmediets egenskaper (t.ex. hårdhet och kelateringsförmåga) kan ha inverkan på testkemikaliens toxicitet. Därför rekommenderas ett fullständigt definierat medium. För närvarande är Elendt M4 och M7 de enda medier som veterligen är lämpliga för långtidsodling av *Daphnia magna*. Båda medierna innehåller kelatbildaren EDTA. Det finns resultat (2) som tyder på att toxiciteten hos kadmium i regel förefaller vara lägre när reproduktionstestet genomförs i M4- och M7-medier än i när det genomförs i medier som inte innehåller EDTA. M4 och M7 rekommenderas därför inte för testning av kemikalier som innehåller metaller. Likaså bör andra medier som innehåller kända kelatbildare undvikas. I fråga om metallhaltiga kemikalier kan det vara tillrådligt att använda ett alternativt medium såsom ASTM-rekonstruerat hårt sötvatten (9) som inte innehåller EDTA. Denna kombination av ASTM-rekonstruerat hårt sötvatten och algextrakt (10) är lämplig för långvarig odling av *Daphnia magna* (2).

Koncentrationen löst syre bör vara över 3 mg/l i början och under testet. pH-värdet bör ligga inom intervallet 6–9, och bör normalt inte variera med mer än 1,5 enheter inom ett test. En vattenhårdhet över 140 mg/l (som $CaCO_3$) rekommenderas. Test på denna nivå och över har kunnat visa en reproduktionskapacitet som uppfyller giltighetskriterierna (11) (12).

Testlösningar

Testlösningar av de valda koncentrationerna bereds i regel genom utspädning av en stamlösning. Om möjligt bör stamlösningarna helst beredas utan användning av lösningsmedel eller dispergeringsmedel. Testkemikalien blandas eller rörs i testmediet med mekaniska hjälpmedel såsom omrörning, sonikering eller andra lämpliga metoder. Testsystemen bör exponeras för koncentrationer av den testkemikalie som ska användas i undersökningen under så lång tid som krävs för att visa att stabila exponeringskoncentrationer kan upprätthållas innan testorganismerna inbegrips. Om testkemikalien är svårlöslig i vatten bör man följa de förfaranden som beskrivs i OECD:s vägledning om hantering av svåra ämnen (13). Man bör undvika att använda lösningsmedel eller dispergeringsmedel, men det kan i vissa fall vara nödvändigt för att framställa en stamlösning med lämplig koncentration för dosering.

En kontroll med utspädningsvatten med lämpliga replikat och, om så krävs, en lösningsmedelskontroll med lämpliga replikat bör inrättas utöver testkoncentrationerna. Endast lösningsmedel eller dispergeringsmedel som bevisat inte har signifikanta eller endast minimala effekter på responsvariabeln bör användas i testet.

▼M7

Exempel på lämpliga lösningsmedel (t.ex. aceton, etanol, metanol, dimetylformamid och trietylenglykol) och dispergeringsmedel (t ex Cremophor RH40, metylcellulosa 0,01 % och HCO-40) ges i (13). Om lösningsmedel eller dispergeringsmedel används bör deras slutkoncentrationer vara högst 0,1 ml/l (13) och koncentrationen bör vara densamma i alla testkärl, förutom utspädningsvattenkontrollen. Användningen av lösningsmedel bör dock begränsas till ett minimum.

FÖRFARANDE

Exponeringsförhållanden

Löptid

Testperiodens längd är 21 dagar.

Fisktäthet

Föräldradjuren hålls individuellt, ett per testkärl, vanligen med 50–100 ml i varje kärl, om inte ett genomflödessystem är nödvändigt för testningen (för *Daphnia magna* kan mindre volymer av mediet vara möjliga, särskilt för mindre daphnider, t.ex. *Ceriodaphnia dubia*).

I vissa fall behövs större volymer med tanke på de krav som gäller för den analytiska procedur som används för bestämning av testkemikaliens koncentration, även om det för den kemiska analysen är tillåtet med pooling av replikat. Om volymer över 100 ml används måste eventuellt den dos som ges till *Daphnia* ökas för att garantera tillräcklig tillgång på foder och förenlighet med giltighetskriterierna.

Försöksdjur:

För ett semistatiskt test behövs minst 10 djur per testkoncentration och minst 10 individuellt hållna djur i kontrollserierna.

För genomflödestest har en uppdelning med 40 djur i fyra grupper om 10 djur per testkoncentration visat sig vara lämplig (1). Ett mindre antal testorganismer kan användas och man rekommenderar ett minimum på 20 djur per koncentration uppdelade i två eller flera replikat med samma antal djur (t.ex. fyra replikat med fem *Daphnia* per replikat). För test där djuren hålls i grupper är det inte möjligt att undanta eventuell avkomma från den statistiska analysen om oavsiktlig dödlighet bland föräldradjuren förekommer när reproduktionen har börjat. I dessa fall kan reproduktionsresultatet uttryckas som totalt antal levande avkommor per föräldradjur i början av testet.

Fördelningen av behandlingar och den efterföljande hanteringen av testkärlen bör vara slumpmässig. I annat fall kan man få missvisande resultat som kan tolkas som en koncentrationsrelaterad verkan. Särskilt om testenheterna hanteras i koncentrationsordning kan vissa tidsrelaterade faktorer, såsom trötthet hos personalen eller andra felfaktorer, leda till större verkningar vid de högre koncentrationerna. Om testresultaten sannolikt kommer att påverkas av omständigheter i början av testet eller av miljöbetingelser, såsom placering i laboratoriet, bör man överväga blockuppdelning.

Utfodring

Vid semistatiskt test ges foder helst dagligen men minst tre gånger per vecka (vid byte av medium). Eventuell utspädning av exponeringskoncentrationerna genom tillsats av foder bör beaktas och undvikas så långt det är möjligt med hjälp av väl koncentrerade algsuspensioner. Avvikelser från detta (t.ex. vid genomflödestest) måste rapporteras.

Under testet bör föräldradjuren helst utfodras med levande algceller. En eller flera av följande arter kan användas: *Chlorella* sp., *Pseudokirchneriella subcapitata* (tidigare *Selenastrum capricornutum*) och *Desmodesmus subspicatus* (tidigare *Scenedesmus subspicatus*). Utfodringen bör grunda sig på mängden organiskt

▼M7

kol (C) som ges till varje föräldradjur. Forskningsresultat (14) för *Daphnia magna* har visat att det är tillräckligt med dosnivåer mellan 0,1 och 0,2 mg organiskt kol per *Daphnia* och dag för att nå upp till den mängd levande avkomma som behövs med tanke på giltighetskriterierna för testet. Dosen kan ges med konstant dosering under hela testet eller, om så önskas, med lägre dosering i början och därefter ökande dosering i takt med föräldradjurens tillväxt. I det senare fallet bör dosen ändå alltid hållas inom det rekommenderade området 0,1–0,2 mg organiskt kol per *Daphnia* och dag.

Om andra matningssätt (t.ex. antalet algceller eller ljusabsorbans) används för att kontrollera utfodringens dosnivå (av bekvämlighetsskäl, eftersom mätning av kolhalten är tidskrävande) bör varje laboratorium upprätta egna nomogram för mätningarna av algodlingens kolhalt (i tillägg 3 finns anvisningar för hur man upprättar nomogram). Nomogrammen måste ses över minst årligen, och oftare om algodlingsbetingelserna har förändrats. Ljusabsorbans har konstaterats vara en bättre metod än cellräkning när det gäller bestämning av kolhalten (15).

Algsuspensionen som används för utfodring av *Daphnia* bör vara koncentrerad, så att minimal volym algodlingsmedium överförs till testkärlen. För att höja algkoncentrationen kan man använda centrifugering med påföljande återuppslamning i *Daphnia*-odlingsmedium.

Ljus

16 timmar ljus med en intensitet som inte överskrider 15–20 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ mätt vid vattenytan av kärlet. För mätinstrument som kalibrerats i lux motsvarar den rekommenderade ljusintensiteten 15–20 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ för kallt vitt ljus ungefär 1 000–1 500 lux.

Temperatur

Temperaturen i testmediet bör hållas inom området 18–22 °C. Inom ett och samma försök får temperaturen om möjligt inte variera med mer än 2 °C inom de angivna gränserna (t.ex. 18-20, 19–21 eller 20–22 °C) som ett dagligt intervall. Temperaturövervakningen kan gärna ordnas med hjälp av ett extra testkärl.

Luftning

Testkärlen bör inte luftas under testet.

Testets utformning

Förtest

Vid behov utförs ett preliminärt test med t.ex. fem koncentrationer av testkemikalien och två replikat för varje testkärl och kontroll. Ytterligare information, från tester med likartade kemikalier eller från litteraturen, om akut toxicitet för *Daphnia* och/eller andra vattenorganismer kan också vara användbar för att avgöra vilka koncentrationsintervall som ska användas i det preliminära testet.

Det preliminära testet pågår i 21 dagar eller tillräckligt länge för att möjliggöra tillförlitliga förutsägelser av effektnivåerna. Reproduktionen bedöms i slutet av testet. Antalet föräldradjur och förekomsten av avkomma bör registreras.

Definitivt test

Normalt bör minst fem testkoncentrationer användas som ligger innanför intervallet för effektiv koncentration (t.ex. EC_x). Koncentrationerna bör ligga i en geometrisk serie med en separationsfaktor som helst inte bör överskrida 3,2. Dessutom bör ett lämpligt antal replikat användas för varje testkoncentration

▼M7

(se punkterna 24–25). Om färre än fem koncentrationer används måste detta motiveras. Kemikalier får inte testas i koncentrationer som överskrider löslighetsgränsen i testmediet. Innan försöket genomförs bör man överväga testets statistiska kraft. Lämpliga statistiska metoder bör användas (4). Vid valet av koncentrationsintervall bör man beakta följande:

i) Om man bestämmer EC_X för verkningar på reproduktionskapaciteten är det tillrådligt att använda tillräckligt antal koncentrationer för att möjliggöra bestämning av EC_x med tillräcklig konfidensnivå. De testkoncentrationer som används bör helst ligga innanför uppskattad EC_x, så att EC_x påvisas genom interpolering i stället för extrapolering. För den efterföljande statistiska analysen är det en fördel att använda fler testkoncentrationer (t.ex. tio) och färre replikat av varje koncentration (t.ex. fem, så att antalet testkärl hålls konstant) med tio kontroller.

ii) Vid beräkning av LOEC och/eller NOEC ska den lägsta testkoncentrationen vara tillräckligt låg så att reproduktionskapaciteten vid denna koncentration inte signifikant lägre än i kontrollgruppen. I annat fall bör testet upprepas med en lägre lägsta koncentration.

iii) Vid beräkning av LOEC och/eller NOEC ska den högsta testkoncentrationen vara tillräckligt hög så att reproduktionskapaciteten vid denna koncentration är signifikant lägre än i kontrollgruppen. Om så inte är fallet bör testet upprepas med en ökad högsta koncentration, om inte den högsta erforderliga testkoncentrationen för testning av kroniska effekter (dvs. 10 mg/l) användes som högsta testkoncentration i det första testet.

Om inga effekter observeras vid den högsta koncentrationen i det preliminära testet (t.ex. vid 10 mg/l) eller om testkemikalien högst sannolikt har en låg eller ingen toxicitet eftersom den inte är toxisk för andra organismer och/eller har ett lågt eller inget upptag, kan reproduktionstestet utföras som ett toleranstest med en testkoncentration på t.ex.10 mg/l och kontrollen. Tio replikat bör användas för både behandlings- och kontrollgrupperna. Om ett toleranstest behöver göras i ett genomflödessystem räcker det med färre replikat. Ett toleranstest gör det möjligt att visa att det inte förekommer någon statistiskt signifikant effekt vid gränskoncentrationen, men om effekter registreras krävs i regel ett fullständigt test.

Kontroller

En kontrollserie för testmediet och i förekommande fall en kontrollserie med lösnings- eller dispergeringsmedlet bör köras utöver testserierna. Kontrollseriernas lösningsmedel eller dispergeringsmedel bör ha samma koncentration som i testkemikalien. Lämpligt antal replikat bör användas (se punkterna 23–24).

I ett väl utfört test bör variationskoefficienten kring det genomsnittliga antalet levande avkommor som i kontrollgrupperna produceras per föräldradjur i regel vara 25 %. Värdet måste rapporteras i testutformningar där djuren hålls individuellt.

Förnyelse av testmediet

Frekvensen för förnyelse av testmediet beror på testkemikaliens stabilitet, men får inte underskrida tre gånger i veckan. Om resultaten från preliminära stabilitetstest (se punkt 7) visar att testkemikalien inte hålls stabil (dvs. utanför området 120–80 % av nominell koncentration eller under 80 % av uppmätt startkoncentration) under det maximala förnyelseintervallet (dvs. tre dagar) bör man överväga förnyelse med kortare intervall eller användning av genomflödestest.

▼M7

Vid semistatiskt test görs förnyelse av mediet genom att en ny serie testkärl ställs i ordning och föräldradjuren överförs till de nya kärlen t.ex. med en glaspipett av lämplig diameter. Volymen medium som överförs tillsammans med *Daphnia* bör vara så liten som möjligt.

Observationer

Resultaten av de observationer som görs under testet registreras på blanketter (se exempel i tilläggen 4 och 5). Om andra mätningar krävs (se punkt 44) behövs eventuellt tilläggsobservationer.

Avkomma

Det rekommenderas att avkommorna från varje föräldradjur tas bort och räknas dagligen efter det att produktionen av avkomma har satt i gäng, för att hindra avkommorna från att konsumera foder som är avsett för föräldradjuret. I test enligt denna metod behöver bara levande avkommor räknas, men förekomsten av aborterade ägg eller döda avkommor bör registreras.

Dödlighet

Mortaliteten bland föräldradjuren bör registreras, helst dagligen eller minst lika ofta som avkommorna räknas.

Övriga parametrar

Även om denna testmetod främst är avsedd för bedömning av verkningarna på reproduktionskapaciteten är det möjligt att övriga verkningar kan kvantifieras i tillräcklig grad med tanke på statistisk analys. Reproduktionskapaciteten per överlevande föräldradjur, dvs. antalet levande avkommor som produceras under testet per överlevande förälder, kan registreras. Detta kan jämföras med den huvudsakliga responsvariabeln (reproduktiv kapacitet per föräldradjur i början av testet, dvs. föräldradjur som inte oavsiktligen dog under testet). Om föräldradjur dör i de exponerade replikaten bör man överväga om dödligheten följer koncentrationsresponsens mönster eller ej, t.ex. om det finns en signifikant regression i responsen jämfört med testkemikaliens koncentration med en positiv kurva (här kan ett statistiskt test som Cochran-Armitages trendtest användas). Om dödligheten inte följer koncentrationsresponsens mönster bör replikat med dödlighet bland föräldradjuren undantas från analysen av testresultatet. Om dödligheten följer ett koncentrations-responsmönster bör föräldradjurens dödlighet anses utgöra en effekt av testkemikalien och replikaten bör inte undantas från analysen av testresultatet. Tillväxtmätningar är ytterst önskvärda eftersom de ger information om eventuella subletala effekter och kan vara användbara som ett komplement till reproduktionsmåtten. Mätningar av föräldradjurens längd (dvs. kroppslängd exklusive analfenan) i slutet av testet rekommenderas. Övriga parametrar som kan mätas eller beräknas är tiden fram till att den första satsen avkomma (och efterföljande satser) produceras, satsernas antal och storlek per djur, antalet aborterade satser, förekomsten av nyfödda hanar (OECD, 2008) eller ephippier och eventuellt den inneboende tillväxthastigheten (definitionen anges i tillägg 1 och identifiering av nyföddas kön beskrivs i tillägg 7).

Frekvens för analytiska bestämningar och mätningar

Syrgashalten, temperaturen, hårdheten och pH bör mätas minst en gång i veckan i färska och gamla medier, i kontrollsatserna och i den högsta testkemikaliekoncentrationen.

Under testets gång bor testkemikaliens koncentrationer bestämmas med regelbundna intervall.

Vid semistatiskt test, där testkemikaliens koncentration bör hållas inom ± 20 % av den nominella koncentrationen (dvs. inom området 80–120 %, se punkterna 6,

▼M7

7 och 39), rekommenderas att de högsta och lägsta testkoncentrationerna analyseras minst en gång under testets första vecka, strax efter beredningen och vid förnyelse (analyserna görs alltså på ett prov av samma lösning – när den är nyberedd och när den förnyas). Dessa bestämningar upprepas därefter minst varje vecka.

Vid test där testkemikaliens koncentration inte förväntas hållas inom ± 20 % av den nominella koncentrationen är det nödvändigt att analysera alla testkoncentrationer, när de är nyberedda och när de förnyas. Vid test där testkemikaliens uppmätta startkoncentration inte ligger inom ± 20 % av den nominella koncentrationen men det finns tillräckliga bevis på att startkoncentrationerna är repeterbara och stabila (dvs. inom området 80–120 % av startkoncentrationerna), kan de kemiska bestämningarna under testets veckorna 2 och 3 begränsas till de högsta och lägsta testkoncentrationerna. Under alla omständigheter behöver bestämning av testkemikaliens koncentration före förnyandet bara göras för ett enda replikatkärl per testämneskoncentration.

Vid genomflödestest kan man lämpligen använda samma provtagningsschema som vid semistatiska test (även om mätningen av ”gammal” lösning då inte är tillämplig). Det kan dock vara tillrådligt att utöka antalet provtagningstillfallen under den första veckan (t.ex. tre mätningar) som kontroll på att testkoncentrationerna hålls stabila. Vid dessa typer av försök bör strömningshastigheten för spädningsmedel och testkemikalien kontrolleras dagligen.

Om man kan visa att testkemikaliens koncentration har hållits tillfredsställande inom ± 20 % av den nominella eller uppmätta startkoncentrationen genom hela testet kan resultaten baseras på nominella eller uppmätta startvärden. Om avvikelsen från nominell eller uppmätt startkoncentration är större än 20 % bör resultaten uttryckas i form av tidsvägda medelvärden (vägledning ges i tillägg 6).

DATA OCH RAPPORTERING

Behandling av resultaten

Syftet med testet är att bestämma testkemikaliens effekt på reproduktionskapaciteten. Totalantalet levande avkommor per föräldradjur beräknas för varje testkärl (varje replikat). Reproduktionen kan dessutom beräknas på grundval av den överlevande föräldraorganismens produktion av levande avkomma. Den miljömässigt mest relevanta responsvariabeln är dock totalt antal levande avkomma som producerats per föräldradjur som inte dör oavsiktligt med eller utan känd orsak ([1]) ([2]) under testet. Om föräldradjuret dör oavsiktligt under testet eller visar sig vara en hane, tas replikatet i fråga inte med i analysen. I ett sådant fall baserar sig analysen på ett reducerat antal replikat. Om föräldradjur dör i de exponerade replikaten bör man överväga om dödligheten följer ett koncentrations-responsmönster eller ej, t.ex. om det finns en signifikant regression i responsen jämfört med testkemikaliens koncentration med en positiv kurva (här kan ett statistiskt test som Cochran-Armitages trendtest användas). Om dödligheten inte följer ett koncentrations-responsmönster bör replikat med dödlighet bland föräldradjuren undantas från analysen av testresultatet. Om dödligheten följer ett koncentrations-responsmönster bör föräldradjurens dödlighet anses utgöra en effekt av testkemikalien och replikaten bör inte undantas från analysen av testresultatet.

När LOEC och NOEC eller EC_x används för att uttrycka effekterna bör man sammanfattningsvis beräkna effekten på reproduktionsförmågan genom användning av båda de responsvariabler som anges ovan, dvs.

([1]) Oavsiktlig dödlighet med känd orsak: icke-kemikalierelaterad dödlighet som orsakas av en oavsiktlig händelse (dvs. känd orsak).

([2]) Oavsiktlig dödlighet utan känd orsak: icke-kemikalierelaterad dödlighet utan känd orsak.

▼M7

— som totalt antal levande avkomma som producerats per föräldradjur som inte dör oavsiktligen med eller utan känd orsak under testet, och

— som antal levande avkomma producerad per överlevande föräldradjur.

Lägsta NOEC och LOEC eller EC_x-värde som beräknas med användning av någon av dessa två responsvariabler används som slutresultat.

Innan man tillämpar den statistiska analysen, t.ex. ANOVA-förfaranden, jämförelser mellan behandlings- och kontrollgrupper med Student t-testet, Dunnetts test, Williams test eller Jonckheere-Terpstra-testet av step-down-typ, bör omvandling av data övervägas om det är nödvändigt för att uppfylla kraven för det aktuella statistiska testet. Som icke-parametriska alternativ kan man överväga Dunns eller Mann-Whitneys test. 95-procentiga konfidensintervaller beräknas för medelvärden för enskilda testkärl.

Antalet överlevande föräldradjur i de obehandlade kontrollerna är ett giltighetskriterium och bör dokumenteras och redovisas. Även alla andra skadliga effekter, t.ex. onormalt beteende och toxikologiskt signifikanta resultat, bör redovisas i den slutliga rapporten.

ECx

ECx-värden, inklusive deras sammanhörande lägre och övre konfidensgränser, beräknas med hjälp av lämpliga statistiska metoder (t.ex. logistiska funktioner eller Weibull-funktioner, den modifierade Spearman-Kärbermetoden eller enkel interpolering). För att beräkna EC10, EC_{50} eller något annat ECx-värde bör en regressionsanalys utföras på hela uppsättningen data.

NOEC/LOEC

Om syftet med den statistiska analysen är att bestämma NOEC/LOEC bör lämpliga statistiska metoder användas i enlighet med OECD:s dokument 54, *Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application* (4). I allmänhet ska negativa effekter av testkemikalien jämfört med kontrollen undersökas genom en ensidig hypotesprövning vid $p \leq 0,05$.

Normalfördelning och variansens homogenitet kan testas med hjälp av ett lämpligt statistiskt test, t.ex. Shapiro-Wilks test respektive Levenes test ($p \leq 0,05$). Ensidig ANOVA och därpå följande flerjämförelsetester kan utföras. Multipla jämförelser (t.ex. Dunnetts test) eller step-down-grundade trendtester (t.ex. Williams test eller Jonckheere-Terpstra-testet av step-down-typ) kan användas för att beräkna huruvida det finns betydande skillnader ($p \leq 0,05$) mellan kontrollerna och de olika testkemikaliekoncentrationerna (välj rekommenderat test i enlighet med OECD:s vägledningsdokument 54 (4)). I annat fall kan icke-parametriska metoder (t.ex. Bonferronis U-test enligt Holm eller Jonckheere-Terpstras trendtest) användas för att bestämma NOEC och LOEC.

Toleranstest

Om ett toleranstest (jämförelse av endast ett testkärl och kontrollen) har utförts och de nödvändiga förutsättningarna för parametriska testförfaranden (normalitet, homogenitet) är uppfyllda, kan metriska responser utvärderas med hjälp av Students test (t-test). Om dessa krav inte uppfylls kan man använda t-testet med olika varians (såsom Welchs t-test) eller ett icke-parametriskt test, såsom Mann-Whitneys U-test.

För att se om det finns betydande skillnader mellan kontrollerna (kontroll samt lösningsmedels- eller dispergeringsmedelskontroll), kan replikaten för varje kontroll testas enligt beskrivningen för toleranstestet. Om man inte upptäcker betydande skillnader med dessa tester kan alla kontroll- och lösningsmedelskontrollreplikat sammanföras. I annat fall bör alla testkärl jämföras med lösningsmedelskontrollen.

▼M7

Testrapport

Testrapporten ska innehålla följande information:

Testkemikalie:

— fysikalisk form och relevanta fysikalkemiska egenskaper,

— kemiska identifieringsuppgifter, inklusive renhetsgrad.

Testade arter:

— klonen (om den har identifierats med genotypen eller inte), leverantör eller ursprung (om uppgiften är känd) och de odlingsbetingelser som har använts. Om annan art än *Daphnia magna* har använts måste detta rapporteras och motiveras.

Testbetingelser:

— Använt testförfarande (t.ex. semistatiskt test eller genomflödestest, volym, antal *Daphnia* per liter).

— ljusperiod och ljusintensitet,

— testets utformning (t.ex. antalet replikat, antalet föräldradjur per replikat),

— detaljuppgifter om det odlingsmedium som har använts,

— i förekommande fall uppgifter om tillsatser av organiskt material och information om sammansättning, ursprung, beredningsmetod, TOC och COD för stamberedningar, uppskattning av resulterande TOC och COD i testmediet,

— detaljerad information om utfodringen, inbegripet mängd (uttryckt som mg kol per *Daphnia* per dag) och schema (t.ex. typen av foder, och i fråga om alger specifikt namn (arter) och i den mån uppgifter finns, stam och odlingsbetingelser),

— metoden för beredning av stamlösningar och förnyelsefrekvensen (i förekommande fall bör även lösnings- eller dispergeringsmedlet och dess koncentration anges).

Resultat:

— Resultaten från eventuella preliminära test gällande testkemikaliens stabilitet.

— Nominella testkoncentrationer och resultatet av alla analyser för att bestämma koncentrationen av testkemikalien i testkärlen (exempel på blankett finns i tillägg 5), metodens utvinningskapacitet och bestämningsgräns bör också rapporteras.

— Vattenkvaliteten i testkärlen (pH, temperatur och halten löst syrgas, i förekommande fall TOC eller COD och hårdhet) (exempel på blanketter finns i tillägg 4).

— En komplett förteckning över produktionen av levande avkomma per föräldradjur under testet (exempel på blankett finns i tillägg 4).

— Antalet föräldradjur som dött och den dag de dött (exempel på blankett finns i tillägg 4).

— Variationskoefficienten för kontrollgruppens reproduktionskapacitet (baserad på det totala antalet levande avkommor per föräldradjur som är vid liv vid testets slut).

— Diagram över totalt antal levande avkomma som producerats per föräldradjur i varje replikat, med undantag för föräldradjur som har dött oavsiktligen under testet, som funktion av testkemikaliens koncentration.

▼M7

— I förekommande fall, ett diagram över antal levande avkomma som producerats per överlevande föräldradjur i varje replikat som funktion av testkemikaliens koncentration.

— Följande uppgifter bör också redovisas: i förekommande fall lägsta koncentration med observerad effekt (LOEC) för reproduktion, inklusive en beskrivning av använda statistiska förfaranden och uppgift om förväntad storleks-effekt som kan detekteras (en kraftanalys kan utföras innan försöket inleds för att lämna denna uppgift) samt nolleffektkoncentration i (NOEC) för reproduktion, information om vilken responsvariabel som har använts för att beräkna LOEC- och NOEC-värdet (antingen som totalt antal avkommor per moderorganism som inte oavsiktligt dog under testet eller som totalt antal levande avkomma per överlevande moderorganism) och i förekommande fall LOEC eller NOEC för dödlighet bland föräldradjur.

— I tillämpliga fall EC_X för reproduktion, konfidensintervall (t.ex. 90 % eller 95 %)och en kurva för den anpassade modell som har använts för beräkningen, lutningen hos koncentrations-responskurvan och dess standardavvikelse.

— Annan observerad eller uppmätt biologisk verkan: rapportera varje observerad eller uppmätt biologisk verkan (t.ex. föräldradjurens tillväxt) tillsammans med alla tillbörliga motiveringar.

— Motiveringar för varje avvikelse från testmetoden.

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 nr 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 nr 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 nr 54. OECD, Paris.

(5) Baird, D.J., m.fl. (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. Femte upplagan. 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., m.fl. (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. Köpenhamn 1988. (H. Løkke, H. Tyle och F. Bro-Rasmussen. Eds.) s. 144–148.

▼M7

(11) Parkhurst, B.R., J.L Forte. och G.P. och Wright (1981) Reproducibility of a life-cycle toxicity test with *Daphnia magna*. Bull. Environ. Contam. and Toxicol., 26: 1–8.

(12) Cowgill, U.M. och 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 nr 23. OECD, Paris.

(14) Sims, I.R., S. Watson. och 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

Tillägg 1

DEFINITIONER

I denna testmetod gäller följande definitioner:

Oavsiktlig dödlighet med känd orsak: icke-kemikalierelaterad dödlighet som orsakas av en oavsiktlig händelse (dvs. känd orsak).

Kemikalie: ett ämne eller en blandning.

Ecx: den koncentration av testkemikalien upplöst i vatten som inom en fastställd exponeringsperiod leder till en minskning på x % av reproduktionskapaciteten hos *Daphnia*.

Oavsiktlig dödlighet utan känd orsak: icke-kemikalierelaterad dödlighet utan känd orsak.

Inneboende tillväxthastighet hos populationen: ett mått på populationens tillväxt vilket omfattar reproduktionskapacitet och åldersspecifik mortalitet (1) (2) (3). I populationer med stabilt tillstånd är värdet på detta mått noll. För växande populationer är värdet positivt och för minskande populationer är värdet negativt. Det senare är inte hållbart och leder i slutändan till utrotning.

Detektionsgräns: den lägsta koncentration som kan detekteras men inte kvantifieras.

Bestämningsgräns: den lägsta koncentration som kan mätas kvantitativt.

Lägsta koncentration med observerad effekt (**LOEC**): den lägsta testade koncentration vid vilken man kan fastställa att testkemikalien har en statistiskt signifikant hämmande effekt på tillväxten (vid $p < 0,05$) inom en given exponeringstid, jämfört med kontrollen. Alla testkoncentrationer ovanför LOEC bör ha skadliga verkningar som är lika stora som eller större än de verkningar som observeras vid LOEC. Om dessa två villkor inte är uppfyllda bör en fullständig förklaring ges till hur man har valt LOEC (och därmed NOEC).

Mortalitet: ett djur registreras som dött när det är orörligt, dvs. när det inte kan simma eller om man inte kan observera rörelser hos bihang eller bakkropp inom 15 sekunder efter en försiktig omrörning i testkärlet. (Eventuell annan definition som används bör rapporteras tillsammans med motsvarande hänvisning.)

Nolleffektkoncentration (No observed effect concentration, NOEC): den testkoncentration omedelbart under LOEC som inom en fastställd exponeringsperiod inte framkallar några statistiskt signifikanta verkningar ($p < 0.05$) jämfört med kontrollgruppen.

Avkomma: de unga *Daphnia* som produceras av föräldragenerationen under testets gång.

Föräldradjur: de *Daphnia*-honor som finns närvarande vid testets början och vars reproduktionskapacitet testas.

Reproduktionskapacitet: antalet levande avkommor som produceras av föräldradjur inom testperioden.

Testkemikalie: alla ämnen eller blandningar som testas med denna testmetod.

LITTERATUR

(1) Wilson, E.O. och Bossert, W.H. (1971). 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, s. 532.

(3) Meyer, J. S., Ingersoll, C. G., McDonald, L.L. och Boyce, M.S. (1986). Estimating uncertainty in population growth rates: Jackknife vs bootstrap techniques. Ecology, 67, 1156–1166.

▼M7

Tillägg 2

BEREDNING AV FULLSTÄNDIGT DEFINIERADE ELENDT M7- OCH M4-MEDIER

Acklimatisering till Elendt M7- och M4-medier

I vissa laboratorier har man stött på svårigheter vid direkt överföring av *Daphnia* till M4- (1) och M7-medier. En viss framgång har uppnåtts med gradvis acklimatisering, dvs. överflyttning från eget medium till 30 % Elendt, sedan till 60 % Elendt och slutligen till 100 % Elendt. Acklimatiseringsperioderna kan behöva vara upp till en månad långa.

Beredning

Spårelement

Separata stamlösningar (I) av enskilda spårelement bereds först i vatten av lämplig renhet, t.ex. avjoniserat, destillerat eller renat med omvänd osmos. Från dessa olika stamlösningar (I) bereds en andra stamlösning (II) som innehåller alla spårelement (kombinerad lösning), dvs.

Stamlösning I (enskilt ämne)	Mängd tillsatt vatten	Koncentration (relaterad till medium M4)	För beredning av den kombinerade stamlösningen II tillsätts följande mängd av stamlösning I till vattnet	
	mg/l		ml/l	
			M 4	M 7
H_3BO_3	57 190	20 000-faldig	1,0	0,25
$MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$	7 210	20 000-faldig	1,0	0,25
LiCl	6 120	20 000-faldig	1,0	0,25
RbCl	1 420	20 000-faldig	1,0	0,25
$SrCl_2 \cdot 6\ H_2O$	3 040	20 000-faldig	1,0	0,25
NaBr	320	20 000-faldig	1,0	0,25
$Mo\ Na_2O_4 \cdot 2\ H_2O$	1 260	20 000-faldig	1,0	0,25
$CuCl_2 \cdot 2\ H_2O$	335	20 000-faldig	1,0	0,25
$ZnCl_2$	260	20 000-faldig	1,0	1,0
$CoCl_2 \cdot 6\ H_2O$	200	20 000-faldig	1,0	1,0
KI	65	20 000-faldig	1,0	1,0
Na_2SeO_3	43,8	20 000-faldig	1,0	1,0
NH_4VO_3	11,5	20 000-faldig	1,0	1,0
$Na_2EDTA \cdot 2\ H_2O$	5 000	2 000-faldig	—	—
$FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$	1 991	2 000-faldig	—	—
Både Na_2EDTA- och $FeSO_4$-lösningarna bereds separat, hälls samman och sätts omedelbart i autoklav. Detta ger:				
Fe-EDTA-lösning		1 000-faldig	20,0	5,0

▼M7

M4- och M7-medier

M4- och M7-medier bereds med användning av stamlösning II, makronäringsämnen och vitaminer, enligt tabellen nedan.

	Mängd tillsatt vatten	Koncentration (relaterad till medium M4)	Mängd stamlösning som tillsätts för beredning av medium	
	mg/l		ml/l	
			M 4	M 7
Stamlösning II (kombinerade spårämnen)		20-faldig	50	50
Stamlösningar för makronäringsämnen (enskilt ämne)				
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	293 800	1 000-faldig	1,0	1,0
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	246 600	2 000-faldig	0,5	0,5
KCl	58 000	10 000-faldig	0,1	0,1
$NaHCO_3$	64 800	1 000-faldig	1,0	1,0
$Na_2SiO_3 \cdot 9\ H_2O$	50 000	5 000-faldig	0,2	0,2
$NaNO_3$	2 740	10 000-faldig	0,1	0,1
KH_2PO_4	1 430	10 000-faldig	0,1	0,1
K_2HPO_4	1 840	10 000-faldig	0,1	0,1
Kombinerad vitaminstamlösning	—	10 000-faldig	0,1	0,1

Den kombinerade vitaminstamlösningen bereds genom att sätta till de tre vitaminerna till en liter vatten enligt nedan.

	mg/l			
Tiaminhydroklorid	750	10 000-faldig		
Cyanokobalamin (B_{12})	10	10 000-faldig		
Biotin	7,5	10 000-faldig		

Den kombinerade vitaminstamlösningen lagras fryst i små alikvoter. Vitaminerna sätts till medierna strax före användningen.

OBS: För att undvika utfällning av salter vid beredning av det kombinerade mediet ska man tillsätta stamlösningsalikvoterna till cirka 500–800 ml avjoniserat vatten och därefter fylla upp till en liter.

OBS: Den första offentliggjorda informationen om M4-medium finns i Elendt, B.P. (1990). Selenium deficiency in crustacea; an ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. Protoplasma, 154, 25–33.

▼M7

Tillägg 3

ANALYS AV TOTALT ORGANISKT KOL (TOC) OCH UPPRÄTTANDE AV NOMOGRAM FÖR TOC I ALGFODER

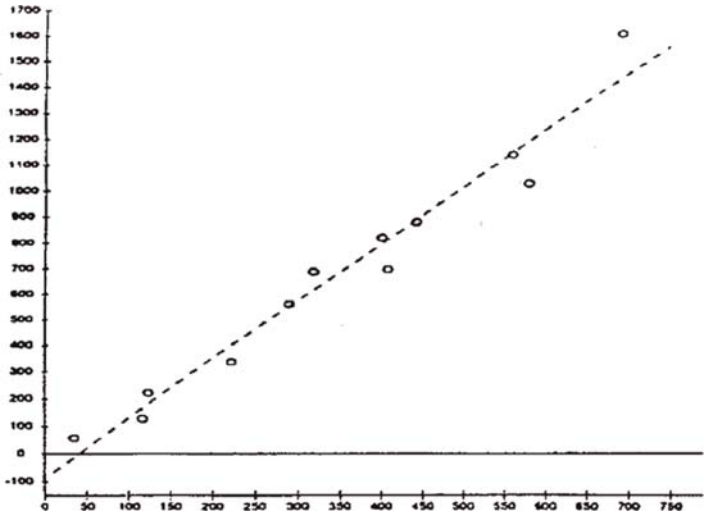
Det är allmänt känt att kolhalten i algfodret i regel inte mäts direkt utan fås genom korrelationer (nomogram) med surrogatmätningar av t.ex. antalet algceller eller ljusabsorbans.

För mätning av TOC är högtemperaturoxidation att föredra framför UV- eller persulfatmetoder. (För råd se *The Instrumental Determination of Total Organic Carbon, Total Oxygen Demand and Related Determinands* 1979, HMSO 1980; 49 High Holborn, London WC1V 6HB).

Före mätningarna för nomogrammet separeras algerna från tillväxtmediet genom centrifugering med påföljande återsuspension i destillerat vatten. För varje prov mäts surrogatparametern och TOC tre gånger. Blindprov med destillerat vatten bör analyseras och TOC-värdet härledas från det TOC-värde som erhållits för algprovet.

Nomogrammen bör vara linjära över det avsedda kolhaltområdet. Nedan visas några exempel.

OBS: Bör inte användas för omvandlingar, det är viktigt att laboratorierna tar fram egna nomogram.



Chlorella vulgaris, var. *viridis* (CCAP 211/12).

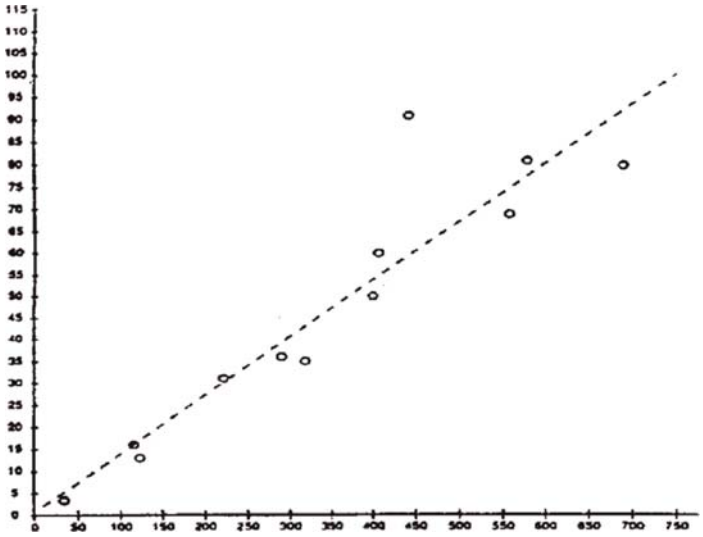
Regression av mg/l torrvikt på mg C/1. Data från koncentrerade suspensioner av celler odlade i semistatisk sats, återuppslammade i destillerat vatten.

x-axel: mg C/1 koncentrerat algfoder

y-axel: mg/1 torrvikt koncentrerat algfoder

Korrigeringskoefficient – 0,980

▼**M7**



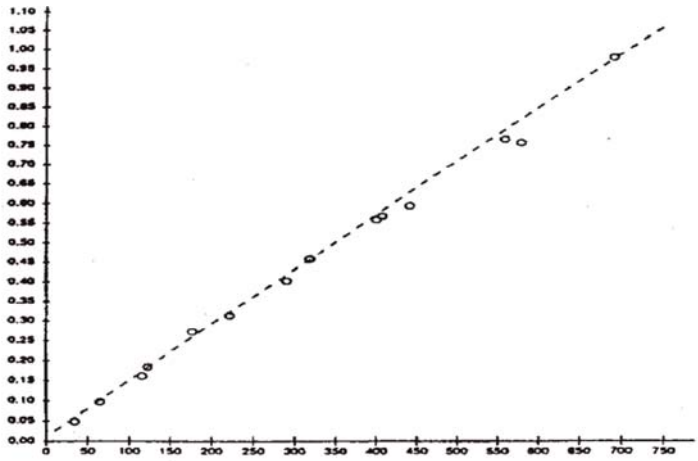
Chlorella vulgaris, var. *viridis* (CCAP 211/12).

Regression av mg/l torrvikt på mg C/1. Data från koncentrerade suspensioner av celler odlade i semistatisk sats, återuppslammade i destillerat vatten.

x-axel: mg C/1 koncentrerat algfoder

y-axel: Antal celler/1 koncentrerat algfoder

Korrigeringskoefficient -0,926



Chlorella vulgaris, var. *viridis* (CCAP 211/12).

Regression av absorbans mg C/1 (1 cm väglängd). Data från koncentrerade suspensioner av celler odlade i semistatisk sats, återuppslammade i destillerat vatten.

x-axel: mg C/1 koncentrerat algfoder

y-axel: Absorbansen vid 440 mm hos en 1:10-utspädning av koncentrerat algfoder

Korrigeringskoefficient – 0,998

▼M7

Tillägg 4

PROVTAGNINGSSCHEMAN FÖR TEST MED EXPONERING VIA VATTEN OCH FÖDA

Försök nr:	Startdatum:						Klon:			Medium:				Typ av foder:				Testkemikalie:					Nominell konc.:	
Dag	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21		
Mediumförnyelse (bocka för)																								
pH (*)																							ny	
																							gammal	
O_2 (mg/l) (*)																							ny	
																							gammal	
Temp (°C) (*)																							ny	
																							gammal	
Utfordring (bocka för)																								
Antal levande avkommor (**)																								Totalt
Kärl 1																								
2																								
3																								
4																								
5																								

▼M7

Försök nr:	Startdatum:						Klon:			Medium:				Typ av foder:				Testkemikalie:					Nominell 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																								
																							Totalt	
Kumulativ föräldramortalitet (***)																								

(*) Ange vilket kärl som användes för försöket.
(**) Markera aborterade satser med ”AB” i relevant ruta.
(***) Markera varje dött föräldraexemplar med ”M” i relevant ruta.

▼M7

Tillägg 5

EXEMPEL PÅ BLANKETT FÖR REGISTRERING AV RESULTAT FRÅN KEMISK ANALYS

a) **Uppmätta koncentrationer**

Nominell konc.	Prov från vecka 1		Prov från vecka 2		Prov från vecka 3	
	Färsk	Gammal	Färsk	Gammal	Färsk	Gammal

b) **Uppmätta koncentrationer uttryckta som procent av nominella koncentrationer**

Nominell konc.	Prov från vecka 1		Prov från vecka 2		Prov från vecka 3	
	Färsk	Gammal	Färsk	Gammal	Färsk	Gammal

▼M7

Tillägg 6

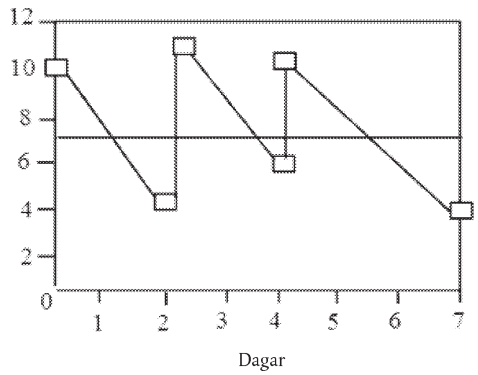
BERÄKNING AV TIDSVÄGT MEDEL VÄRDE

Tidsvägt medelvärde

Utifrån det faktum att testkemikaliens koncentration kan sjunka under perioderna mellan mediumförnyelse är det nödvändigt att överväga vilken koncentration man ska anse utgöra representativ koncentration för det koncentrationsområde som föräldragenerationen av *Daphnia* exponeras för. Valet ska basera sig på både biologiska och statistiska faktorer. Om man t.ex. tror att fortplantningen mest påverkas av den högsta koncentrationen som förekommer ska den koncentrationen användas som representativ koncentration. Om däremot ackumulerade verkningar eller långtidsverkningar av den toxiska kemikalien anses vara viktigare ska medelkoncentrationen användas. I det fallet är det lämpligt att använda tidsvägd medelkoncentration eftersom den beräknas med beaktande av de variationer som den momentana koncentrationen genomgår över tiden.

Figur 1

Exempel på tidsvägt medelvärde



I figur 1 visas ett exempel på ett (förenklat) test som omfattar 7 dagar och där mediumförnyelse görs dag 0, 2 och 4.

— Den tunna linjen som går upp och ned representerar momentana koncentrationer. Den minskade koncentrationen antas följa en exponentiell sönderfallsprocess.

— De 6 avsatta punkterna representerar observerade koncentrationer som har uppmätts vid början och slutet av varje förnyelseperiod.

— Den tjocka horisontella linjen indikerar nivån för det tidsvägda medelvärdet.

Det tidsvägda medelvärdet beräknas så, att arean under det tidsvägda medelvärdet är lika stor som arean under koncentrationskurvan. Beräkningen för exemplet i figuren ovan illustreras i tabell 1.

Tabell 1

Beräkning av tidsvägt medelvärde

Förnyelse Nr	Dagar	Konc. 0	Konc. 1	Ln (Konc. 0)	Ln (Konc. 1)	Area
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

Förnyelse Nr	Dagar	Konc. 0	Konc. 1	Ln (Konc. 0)	Ln (Konc. 1)	Area
Totalt antal dagar:	7				Totalarea:	50,092
					Tidsvägt medeltal:	7,156

Dagar avser antalet dagar i förnyelseperioden.

Konc 0 är den uppmätta koncentrationen vid varje förnyelseperiods början.

Konc 1 är den uppmätta koncentrationen vid varje förnyelseperiods slut.

Ln(konc 0) är den naturliga logaritmen av Konc 0

Ln(konc 1) är den naturliga logaritmen av Konc 1

Area är arean under den exponentiella kurvan för varje förnyelseperiod. Den beräknas enligt följande:

$$Area = \frac{Conc\ 0 - Conc\ 1}{Ln(Conc\ 0) - Ln(Conc\ 1)} \times Day$$

Det tidsvägda medelvärdet (*TW Mean*) är värdet för *Totalarea* dividerat med värdet för *Dagar* totalt.

För *Daphnia*-reproduktionstest bör tabellen utökas så att den sträcker sig över 21 dagar.

När observationer görs endast i början och slutet av varje förnyelseperiod är det uppenbart att det inte ar möjligt att bekräfta att sönderfallsprocessen verkligen är exponentiell. En annorlunda kurva skulle resultera i en annorlunda beräkning av värdet för Area. Det är dock inte osannolikt att sönderfallsprocessen är exponentiell och därför är en sådan kurva troligen det bästa alternativet, i brist på annan information.

Däremot finns det anledning att se upp om man genom den kemiska analysen vid förnyelseperiodens slut inte lyckas få fram någon halt av kemikalien. Om det inte är möjligt att uppskatta hur snabbt kemikalien har försvunnit ur lösningen är det inte möjligt att få en realistisk area under kurvan, och följaktligen inte heller möjligt att få ett meningsfullt tidsvägt medelvärde.

▼M7

Tillägg 7

RIKTLINJER FÖR IDENTIFIERING AV KÖN PÅ NYFÖDDA DJUR

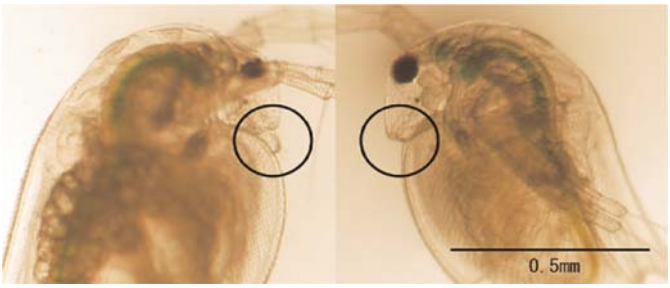
Produktion av nyfödda hanar kan uppstå under föränderliga miljöförhållanden, t.ex. förkortade fotoperioder, temperatur, minskande foderkoncentration och ökad populationstäthet (Hobaek och Larson, 1990, Kleiven m.fl., 1992). Produktion av nyfödda hanar är också en känd respons på vissa insektsmedel (Oda m.fl., 2005). Under förhållanden där kemiska stressfaktorer ger upphov till en minskning av reproduktiv avkomma från partenogenetiska honor kan ett ökat antal hanar förväntas (OECD, 2008). Enligt tillgänglig information är det inte möjligt att förutsäga vilket förhållande mellan könen eller vilken endpoint för reproduktion som är känsligast. Det finns dock vissa indikationer (se ”valideringsrapporten”, del 1) på att en ökning av antalet hanar kan vara mindre känslig än minskad avkomma. Eftersom det primära syftet med testmetoden är att bedöma antalet producerad avkomma är förekomsten av hanar en valfri observation. Om denna alternativa endpoint utvärderas i en undersökning bör ett ytterligare testvalideringskriterium på högst 5 % hanar användas.

Det mest praktiska och enklaste sättet att skilja mellan könen hos *Daphnia* är att använda deras fenotypiska egenskaper, eftersom hanar och honor är genetiskt identiska och könet är miljöbestämt. Hanar och honor skiljer sig åt i längd och när det gäller morfologin hos den första antennen, som är längre hos hanar än honor (fig.1). Denna skillnad är igenkännbar direkt efter födseln, även om andra sekundära könsegenskaper utvecklas när de växer (se t.ex. fig. 2 i Olmstead och LeBlanc, 2000).

För att observera morfologiskt kön bör nyfödda som producerats av varje testdjur överföras med pipett och placeras i en petriskål med testmediet. Mediet hålls till ett minimum för att begränsa djurens rörelser. Observation av den första antennen kan göras med stereomikroskop (× 10–60).

Figur 1:

24-timmar gammal hane (till vänster) och hona (höger) *D. magna*. Hanar kan särskiljas från honor genom längden och morfologin hos det första sprötet enligt cirklarna (Tatarazako *m.fl.*, 2004).



LITTERATUR

Hobaek A och 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., och 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* reproduction test. OECD Series on Testing and Assessment, Number 88. Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling (OECD), 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 JORDLEVANDE MIKROORGANISMER: TEST RÖRANDE OMVANDLING AV KVÄVE

1. METOD

Denna testmetod är i stort sett identisk med OECD TG 216 (2000).

1.1 INLEDNING

Den testmetod som beskrivs här är en laboratoriemetod för undersökning av vilka långtidseffekter en engångsexponering av en kemikalie kan ha på jordlevande mikroorganismers omvandling av kväve. Testmetoden grundar sig i huvudsak på rekommendationerna från Växtskyddsorganisationen för Europa och Medelhavsområdet (EPPO) (1). Även övriga riktlinjer har beaktats, till exempel riktlinjerna från Biologische Bundesanstalt i Tyskland (2), Environmental Protection Agency i USA (3) SETAC (4) och Internationella standardiseringsorganisationen (5). Vid en OECD-workshop om valet av jord och sediment i Belgirate, Italien, 1995 (6), kom man överens om hur många och vilka jordtyper som ska användas i detta test. Rekommendationerna för insamling, hantering och lagring av jordprover grundar sig på ISO-riktlinjer (7) och rekommendationer från workshopen i Belgirate. Vid bedömning och utvärdering av olika ämnens toxiska egenskaper kan det vara nödvändigt att bestämma effekterna på den mikrobiella aktiviteten i jorden, till exempel när det behövs upplysningar om potentiella bieffekter som växtskyddsprodukter kan ha på mikrofloran i jorden, eller när det kan förväntas att de jordlevande mikroorganismerna exponeras för andra kemikalier än växtskyddsprodukter. Testet rörande omvandling av kväve görs för att bestämma sådana kemikaliers effekter på mikrofloran i jorden. Vid testning av jordbrukskemikalier (till exempel växtskyddsprodukter, gödselmedel, skogskemikalier) bör testet omfatta både omvandling av kväve och omvandling av kol. För övriga kemikalier är det tillräckligt med test rörande omvandling av kväve. När sådana kemikalier testas rörande omvandling av kväve och man får EC_{50}-värden som faller inom samma område som gäller för kommersiellt tillgängliga nitrifikationshämmande medel (till exempel nitrapyrin), kan man även göra test rörande omvandling av kol i syfte att få ytterligare upplysningar.

Jord består av levande och icke-levande komponenter som förekommer i komplexa och heterogena sammansättningar. Mikroorganismerna spelar en viktig roll för nedbrytning och omvandling av organiskt material i fertila jordar. Det finns många olika arter av mikroorganismer som inverkar på olika aspekter av jordens fertilitet. Långvariga störningar av dessa biokemiska processer kan även störa kretsloppet av näringsämnen, vilket i sin tur kan leda till förändringar av jordens fertilitet. Omvandling av kol och kväve sker i alla fertila jordar. Även om de mikrobsamhällen som utför dessa processer varierar från jord till jord, följer omvandlingen i huvudsak samma mönster.

Syftet med den testmetod som beskrivs här är att upptäcka de skadliga långtidseffekter som ett ämne kan ha på omvandlingen av kväve i aerob ytjord. Testmetoden kan också användas för att uppskatta olika ämnens effekter på den omvandling av kol som utförs av mikrofloran i jorden. Nitratbildning sker efter att kol-kvävebindningarna har brutits. Om nitratproduktionen sker med samma hastighet i behandlad jord och kontrolljord, är det därför mycket sannolikt att de viktigaste kolnedbrytningsfunktionerna är intakta och välfungerande. Det substrat som har valts för testet (lusernmjöl) har en gynnsam kol/kvävekvot (i regel mellan 12/1 och 16/1). Därigenom reduceras kolbristen under testets gång, och om ett mikrobsamhälle skadas av en kemikalie är det möjligt att det återhämtar sig inom 100 dagar.

▼B

De test som har använts som grund för denna testmetod är primärt utformade för situationer där den mängd ämne som når jorden kan förutses. Så är fallet till exempel för växtskyddsprodukter där man känner till den mängd som har applicerats på en åker. För jordbrukskemikalier räcker det med att testa två sådana doser som är relevanta med tanke på den förväntade dosen. Jordbrukskemikalier kan testas med avseende på aktiva ämnen eller produktsammansättningar. Testet är dock inte begränsat till jordbrukskemikalier. Genom att ändra både mängderna testämne som tillförs jorden och metoderna för utvärdering av data, kan testet även användas för situationer där mängden kemikalie som förväntas nå jorden inte är känd. På så sätt kan man i fråga om andra kemikalier än jordbrukskemikalier bestämma effekterna av en serie koncentrationer på omvandlingen av kväve. Erhållna testdata används för att rita upp en dos-responskurva och beräkna EC_x-värden, där x är den procentuella effekten.

1.2 DEFINITIONER

Omvandling av kväve: Den slutliga nedbrytningen av kvävehaltigt material genom inverkan av mikroorganismer. Nedbrytningen sker via ammonifiering och nitrifiering, och utmynnar i den oorganiska slutprodukten nitrat.

EC_x (effektiv koncentration): Den koncentration av testämnet i jorden som leder till att omvandlingen av kväve till nitrat hämmas till x procent.

EC_{50} (median effektiv koncentration): Den koncentration av testämnet i jorden som leder till att omvandlingen av kväve till nitrat hämmas till 50 procent.

1.3 REFERENSÄMNEN

Inga.

1.4 PRINCIP FÖR TESTMETODEN

Siktad jord förbättras med växtmjöl och behandlas med testämnet eller lämnas obehandlad (kontrollprov). Vid testning av jordbrukskemikalier rekommenderas minst två testkoncentrationer, och dessa bör väljas med beaktande av den högsta koncentration som kan förväntas nå jorden. Efter 0, 7, 14 och 28 dagars inkubation behandlas jordproverna (behandlad jord och kontrolljord) med ett lämpligt lösningsmedel och extrakten analyseras med avseende på nitratmängd. Nitratbildningshastigheten i behandlade prover jämförs med den i kontrollproverna, och den procentuella avvikelsen mellan behandlade prover och kontrollprover beräknas. Alla test bör omfatta minst 28 dagar. Om skillnaderna mellan behandlade och obehandlade prover är minst 25 % dag 28, görs fortsatta bestämningar under en period som maximalt sträcker sig till dag 100. Vid testning av andra kemikalier än jordbrukskemikalier tillförs en serie koncentrationer av testämnet till jordproverna och mängderna bildat nitrat i behandlade och obehandlade prover bestäms efter inkubation i 28 dagar. Resultaten från test med flera koncentrationer analyseras med hjälp av en regressionsmodell och relevanta EC_X-värden beräknas (till exempel EC_{50}, EC_{25} och/eller EC_{10}). Se definitionerna.

1.5 TESTETS GILTIGHET

Utvärderingen av testresultat rörande jordbrukskemikalier baserar sig på relativt små skillnader (till exempel medelvärde ±25 %) mellan nitratkoncentrationerna i obehandlade och behandlade jordprover. Därför kan stora variationer i de obehandlade proverna leda till falska resultat. Variationen mellan obehandlade replikatprover bör därför vara mindre än ±15 %.

▼B

1.6 BESKRIVNING AV TESTMETODEN

1.6.1 **Utrustning**

Provbehållarna bör vara tillverkade av kemiskt inert material. Deras volym bör anpassas till det förfarande som används för inkubation av jorden, till exempel inkubation som bulk eller som en serie individuella jordprover (se avsnitt 1.7.1.2). Det är viktigt att minimera vattenförlusterna och sörja för gasväxling under testets förlopp (provbehållarna kan till exempel täckas med perforerad polyetylenfilm). Vid testning av flyktiga ämnen bör förseglingsbara och gastäta behållare användas. Behållarnas storlek bör anpassas så att jordprovet upptar cirka en fjärdedel av behållarens volym.

Därutöver behövs normal laboratorieutrustning, enligt följande:

— Omrörare: en mekanisk skakapparat eller motsvarande.

— Centrifug (3 000 g) eller filtreringsutrustning (med nitratfritt filterpapper).

— Instrument för nitratanalys, med adekvat känslighet och reproducerbarhet.

1.6.2 **Valet av jord och antal jordtyper**

Endast en typ av jord används. Följande rekommendationer gäller för jorden:

— Sandhalt: minst 50 % och högst 75 %.

— pH: 5,5–7,5.

— Halten organiskt kol: 0,5–1,5 %.

— Den mikrobiella biomassan bör bestämmas (8), (9) och dess kolhalt bör vara minst 1 % av jordens totala organiska kol.

I de flesta fall är jord med dessa egenskaper ett exempel på sämsta möjliga situation – adsorptionen av testämnet är minimal, medan mikrofloran har maximal tillgång till testämnet. Det betyder att det i regel inte behövs test med andra typer av jord. I vissa fall, till exempel där testämnet mestadels förväntas hamna i speciella jordar såsom sura skogsjordar eller om testämnet består av elektrostatiskt laddade kemikalier, kan det vara nödvändigt att använda en extra jordtyp.

▼B

1.6.3 **Insamling och lagring av jordprover**

1.6.3.1 *Insamling*

Man bör ha tillgång till detaljerade upplysningar om historian för den plats där testjorden tas. Upplysningarna bör omfatta exakt läge, växtlighetstäcke, datum för behandlingar med växtskyddsprodukter, behandlingar med organiska och oorganiska gödselmedel, tillförsel av biologiska material eller oavsiktlig förorening. Den plats som väljs för provtagningen bör vara lämpad för långtidsanvändning. Lämpliga platser är flerårig ängsmark, åkrar med ettåriga spannmålsgrödor (utom majs) och tättsådda grönbeten. Vid provtagningstidpunkten måste det ha gått minst ett år från en eventuell behandling av provtagningsplatsen med växtskyddsprodukter. Det bör även ha gått minst sex månader från tillförsel av organiska gödselmedel. Användning av mineralgödselmedel är godtagbar endast när detta sker med utgångspunkt från grödans behov. Jordprover får inte tas förrän det har gått minst tre månader från gödslingen. Jord som har behandlats med gödselmedel med kända biocideffekter (till exempel kalciumcyanid) bör undvikas.

Provtagning bör undvikas under eller strax efter långa perioder (längre än 30 dagar) av torka eller vattenmättnad. På plöjd mark ska jordproverna tas på ett djup mellan 0 och 20 cm. På gräsmark (ängar) eller annan mark som plöjs sällan (minst en växtsäsong mellan varje plöjning) kan maximidjupet för provtagningen vara lite mer än 20 cm (till exempel 25 cm).

Jordproverna ska transporteras i behållare, och temperaturbetingelserna bör vara sådana att det inte finns risk för signifikanta förändringar av jordens ursprungliga egenskaper.

1.6.3.2 *Lagring*

De jordprover som används ska helst vara nytagna. Om lagring i laboratoriet inte kan undvikas kan jordproverna hållas i mörker vid 4 ±2 °C under högst tre månader. Det är viktigt att lagringsbetingelserna är aeroba. Om jordprover tas från områden där marken är frusen under minst tre månader per år kan proverna lagras vid - 18 °C till - 22 °C under högst sex månader. Den mikrobiella biomassan hos lagrade jordprover bestäms före varje försök. Biomassans kolhalt bör vara minst 1 % av jordens totala kolhalt (se avsnitt 1.6.2).

1.6.4 **Hantering och beredning av jordprover som testas**

1.6.4.1 *Förinkubation*

För jordprover som har lagrats (se avsnitt 1.6.3.2) rekommenderas en förinkubation under 2–28 dagar. Under förinkubationen bör jordprovet ha samma temperatur och fukthalt som under själva testet (se avsnitten 1.6.4.2 och 1.7.1.3).

▼B

1.6.4.2 *Fysikalisk-kemiska egenskaper*

Stora föremål (till exempel stenar och växtdelar) avlägsnas manuellt ur jorden, som därefter siktas fuktig, utan att torkas alltför mycket, till en partikelstorlek som är högst 2 mm. Jordprovets fukthalt justeras med destillerat eller avjoniserat vatten till ett värde mellan 40 % och 60 % av den maximala vattenkapaciteten.

1.6.4.3 *Förbättring med organiskt substrat*

Jorden ska förbättras med ett lämpligt organiskt substrat, till exempel lusern- och gräsmjöl (huvudbeståndsdel: *Medicago sativa* (blålusern) som har en kol/kväve-kvot mellan 12/1 och 16/1. Den rekommenderade kvoten mellan lusern och jord är 5 g lusern per kilogram jord (torrvikt).

1.6.5 **Beredning av testämnet för applicering i jorden**

Testämnet appliceras i regel med hjälp av en vehikel. Som vehikel kan vatten användas (för vattenlösliga ämnen) eller ett inert fast material såsom fin kvartssand (partikelstorlek: 0,1–0,5 mm). Vätskeformiga vehiklar andra än vatten (till exempel organiska lösningsmedel såsom aceton och kloroform) bör undvikas eftersom de kan skada mikrofloran. Om sand används som vehikel kan den beläggas med testämnet upplöst eller suspenderat i ett lämpligt lösningsmedel. Lösningsmedlet avlägsnas därefter genom avdunstning innan den belagda sanden blandas i jorden. För en optimal fördelning av testämnet i jorden rekommenderas 10 g sand per kilogram jord (torrvikt). Kontrollproverna behandlas med lika stor mängd rent vatten eller ren kvartssand.

Vid testning av flyktiga kemikalier bör förluster under behandlingen minimeras. Likaså bör en homogen fördelning i jorden säkerställas (testämnet bör exempelvis injiceras på flera ställen i jorden).

1.6.6 **Testkoncentrationer**

Vid testning av jordbrukskemikalier bör minst två koncentrationer användas. Den lägre koncentrationen bör minst motsvara den maximimängd som i praktiken förväntas nå jorden, och den högre koncentrationen bör vara en multipel av den lägre koncentrationen. Vid beräkning av koncentrationerna för det testämne som tillförs jorden antas att upptaget är enhetligt ned till jorddjupet 5 cm och att bulkdensiteten är 1,5. Vid testning av jordbrukskemikalier som appliceras direkt i jorden eller kemikalier där den mängd som når jorden kan förutses, rekommenderas dels den maximala PEC-koncentrationen (Predicted Environmental Concentration), dels en femfaldig koncentration av denna. Ämnen som förväntas bli applicerade i jorden flera gånger under en säsong bör testas vid koncentrationer som fås genom att multiplicera PEC-koncentrationen med det maximala antalet förväntade appliceringar. Den högsta testkoncentrationen bör dock inte överskrida mer än tio gånger den maximala koncentrationen vid en enskild applicering. Vid testning av andra kemikalier än jordbrukskemikalier används en geometrisk serie med minst fem koncentrationer. Testkoncentrationerna bör täcka det område som behövs för att bestämma EC_x-värden.

▼B

1.7 TESTETS UTFÖRANDE

1.7.1 **Exponeringsbetingelser**

1.7.1.1 *Behandlade prover och kontrollprover*

Vid testning av jordbrukskemikalier delas jorden i tre delar med lika vikt. Två delar blandas med vehikel plus produkt och den tredje blandas med ren vehikel (kontrollprov). Minst tre replikat rekommenderas för behandlade respektive obehandlade jordprover. Vid testning av andra kemikalier än jordbrukskemikalier delas jorden i sex delar med lika vikt. Fem prover blandas med vehikel plus testämne och det sjätte provet blandas med ren vehikel. Tre replikat rekommenderas för behandlade prover respektive kontrollprov. Det är viktigt att säkerställa en homogen fördelning av testämnet i de behandlade jordproverna. Vid inblandningen bör kompaktering eller klumpbildning av jorden undvikas.

1.7.1.2 *Inkubation av jordprover*

Inkubationen av jordprover kan utföras på två olika sätt. Den kan göras med bulkprover av varje behandlat och obehandlat jordprov eller som en serie individuella och lika stora delprover av varje behandlat och obehandlat jordprov. Vid testning av flyktiga ämnen bör man dock alltid använda en serie individuella delprover. Vid inkubation i form av bulk bereds stora mängder av behandlade och obehandlade jordprover. Under testets gång tas behövligt antal delprover för analys. De mängder som bereds för behandlade och obehandlade jordprover beror på storleken hos de delprover som ingår, antalet replikat som används för analys och det förväntade antalet provtagningsgånger. Jordprover som inkuberas i form av bulk bör blandas grundligt innan delprover tas. När jordprover inkuberas i form av en serie individuella prover, delas varje behandlat och obehandlat prov upp i det antal delprover som behövs och används därefter på planerat sätt. Om det är sannolikt med fler än två provtagningstillfällen bör tillräckligt antal delprover beredas med tanke på alla replikat och alla provtagningstillfällen. Minst tre replikatprover av testjorden bör inkuberas under aeroba betingelser (se avsnitt 1.7.1.1). Alla testbehållare som används bör ha ett tillräckligt utrymme ovanför vätskeytan för att anaeroba betingelser inte ska uppstå. Vid testning av flyktiga ämnen bör testet alltid göras med en serie individuella delprover.

1.7.1.3 *Testbetingelser och testperiodens längd*

Testet genomförs i mörker vid en rumstemperatur på 20 ±2 °C. Under testets gång bör jordprovernas fukthalt hållas vid 40–60 % av jordens maximala vattenkapacitet (se avsnitt 1.6.4.2). Tillåten variation är ±5 %. Destillerat eller avjoniserat vatten kan tillföras vid behov.

Testet bör omfatta en period på minst 28 dagar. Vid testning av jordbrukskemikalier jämförs nitratbildningshastigheten i behandlade prover och kontrollprover. Om avvikelsen är högre än 25 % dag 28, förlängs testet tills skillnaden är högst 25 % eller tills testet har varat 100 dagar, beroende på vilken gräns som nås först. För andra kemikalier än jordbrukskemikalier avslutas testet efter 28 dagar. På dag 28 bestäms nitratmängderna i behandlade jordprover och kontrollprover, och EC_x-värden beräknas.

▼B

1.7.2 **Provtagning och analys av jordprover**

1.7.2.1 *Provtagningsschema*

Vid testning av jordbrukskemikalier analyseras jordproverna med avseende på nitrat, dag 0, 7, 14 och 28. Om testperioden måste förlängas görs tilläggsbestämningarna med 14 dagars intervall efter dag 28.

Vid testning av andra kemikalier än jordbrukskemikalier används minst fem testkoncentrationer, och nitratanalys görs på jordproverna i början (dag 0) och i slutet av exponeringsperioden (dag 28). En delbestämning kan göras till exempel dag 7 om det bedöms vara nödvändigt. De resultat som erhålls dag 28 används för att bestämma EC_x-värdet för kemikalien. Om så önskas kan kontrollprovernas data från dag 0 användas för att rapportera jordens ursprungliga nitrathalt.

1.7.2.2 *Analys av jordprover*

Mängden nitrat som har bildats i vart och ett av de behandlade proverna och kontrollreplikat bestäms för varje provtagningstidpunkt. Nitratet extraheras ur jorden genom att proverna skakas med ett lämpligt lösningsmedel, till exempel 0,1 M kaliumkloridlösning. 5 ml KCl-lösning per gram jord (torrvikt) rekommenderas. För optimal extraktion bör behållarna med jord och extraktionslösning inte vara fyllda mer än till hälften. Blandningarna skakas vid 150 rpm under 60 minuter. Blandningarna centrifugeras eller filtreras och vätskefasens analyseras med avseende på nitrat. Partikelfria vätskeextrakt kan lagras före analys vid - 20 ±5 ^{o}C i högst sex månader.

2. **DATA**

2.1 BEHANDLING AV RESULTATEN

Vid testning av jordbrukskemikalier registreras mängden nitrat som har bildats i varje replikatprov, och medelvärdena för alla replikat ges i tabellform. Kväveomvandlingshastigheterna utvärderas med lämpliga och allmänt accepterade statistiska metoder (till exempel F-test, 5 % signifikansnivå). Mängderna bildat nitrat uttrycks som mg nitrat/kg torrvikt jord/dag. Nitratbildningshastigheten i varje behandlat prov jämförs med hastigheten i kontrollprovet, och den procentuella avvikelsen från kontrollprovet beräknas.

Vid testning av andra kemikalier än jordbrukskemikalier bestäms mängden nitrat som har bildats i varje replikat, och en dos-responskurva ritas upp för uppskattningen av EC_x-värden. Mängderna nitrat i de behandlade proverna (mg nitrat/kg torrvikt jord) dag 28 jämförs med mängderna i kontrollproverna. Resultatet används för beräkning av den procentuella hämningen för varje testkoncentration. Dessa procentvärden ritas upp mot koncentrationen, och EC_x-värden beräknas med hjälp av statistiska metoder. Konfidensgränserna ($p = 0,95$) för de beräknade EC_x-värdena bestäms med standardmetoder (10) (11) (12).

Om kvävehalterna i de ämnen som testas är höga kan detta påverka mängden nitrat som bildas under testet. Om sådana ämnen testas vid en hög koncentration (till exempel kemikalier som sannolikt kommer att appliceras vid upprepade tillfällen) måste testet omfatta tillbörliga kontrollprover (jord med testämne men utan växtmjöl). De värden som fås för dessa kontrollprover måste beaktas vid beräkning av EC_x.

▼B

2.2 TOLKNING AV RESULTATEN

Om resultaten från test rörande jordbrukskemikalier tyder på att nitratbildningshastigheten vid den lägre behandlingsnivån (den maximala förväntade koncentrationen) avviker från hastigheten vid kontrollnivån med högst 25 % vid alla provtagningstidpunkter efter dag 28, kan man anse att produkten inte har någon långtidseffekt på kväveomvandling i jord. Vid utvärdering av test rörande andra ämnen än jordbrukskemikalier används värden för EC_{50}, EC_{25} och/eller EC_{10}.

3. **RAPPORTERING**

Testrapporten ska innehålla nedan angivna uppgifter.

Fullständig identifiering av jorden, inbegripet

— platsens geografiska data (latitud, longitud),

— upplysningar om platsens historia (växtlighetstäcke, behandlingar med växtskyddsprodukter, behandlingar med gödselmedel, oavsiktlig förorening och dylikt),

— användningsmönster (till exempel jordbruksmark eller skog),

— provtagningsdjup (cm),

— halten sand/slam/lera (% torrvikt),

— pH (i vatten),

— halten organiskt kol (% torrvikt),

— halten kväve (% torrvikt),

— ursprunglig nitrathalt (mg nitrat/kg torrvikt),

— katjonbyteskapacitet (mmol/kg),

— mikrobiell biomassa angiven som procentandel av totalt organiskt kol,

— vilka metoder som har använts för bestämning av varje parameter,

— alla upplysningar som hör samman med insamling och lagring av jordproverna,

— detaljupplysningar om eventuell förinkubation av jorden.

Testämne:

— fysikalisk natur och relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper,

— kemiska identifieringsdata med angivelse av, där det är relevant, strukturformel, renhetsgrad (för växtskyddsprodukter procentandelen aktivt ämne), kvävehalt.

Substrat:

källa,

— sammansättning (till exempel lusernmjöl eller lusern- och gräsmjöl),

— halten kol, kväve (% torrvikt),

— siktstorlek (mm).

▼B

Testbetingelser:

— detaljupplysningar om förbättring av jorden med organiskt substrat,

— antalet koncentrationer av testkemikalien och, där det är relevant, motivering för de valda koncentrationerna,

— detaljupplysningar om hur testämnet har tillförts jorden,

— inkubationstemperatur,

— jordens fukthalt vid testets början och under testets gång,

— inkubationsmetod (som bulk eller som en serie individuella delprover),

— antalet replikat,

— provtagningstidpunkter,

— metod för extraktion av nitrat ur jorden.

Resultat:

— analysförfarande och apparatur som har använts för analys av nitrat,

— data i tabellform inbegripet individuella och genomsnittliga värden för nitratbestämningarna,

— variationen mellan replikaten för behandlade prover och kontrollprover,

— redogörelse för justeringar som har gjorts vid beräkningarna (om relevant),

— den procentuella variationen för nitratbildningshastigheterna vid varje provtagningstidpunkt eller, där det är relevant, EC_{50}-värde med 95 procents konfidensgräns, övriga EC_x-värden (till exempel EC_{25} eller EC_{10}) med konfidensintervall och en dos-responskurva,

— statisk behandling av resultaten,

— alla upplysningar och observationer som kan vara till nytta vid tolkningen av resultaten.

4. **HÄNVISNINGAR**

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 (andra utgåvan, 1990).

3. EPA (1987), Soil Microbial Community Toxicity Test. EPA 40 CFR Part 797.3700. Toxic Substances Control Act Test Guidelines; Proposed rule, den 28 september 1987.

4. SETAC-Europe (1995), Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides, red. M. R. Lynch, Pub. SETAC-Europe, Bryssel.

5. ISO/DIS 14238 (1995), Markundersökningar – Bestämning av kvävemineralisering och nitrifiering i jord och kemikaliers inverkan på dessa processer, 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, den 18–20 januari 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), ”Markundersökningar – Bestämning av markens mikrobiella biomassa – Del 1: Sustratinducerad respirationsmetod”.

9. ISO 14240-2 (1997), Markundersökningar – Bestämning av markens mikrobiella biomassa – Del 2: Fumigering – extraheringsmetod.

10. J. T. Litchfield, och F. Wilcoxon (1949), A simplified method of evaluating dose-effect experiments, Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, 99–113.

11. D. J. Finney, (1971), Probit Analysis, tredje utgåvan, Cambridge, London och New York.

12. D. J. Finney, (1978), Statistical Methods in biological Assay. Griffin, Weycombe, Förenade kungariket.

▼B

C.22 JORDLEVANDE MIKROORGANISMER: TEST RÖRANDE OMVANDLING AV KOL

1. METOD

Denna metod är i stort sett identisk med OECD TG 217 (2000).

1.1 INLEDNING

Den testmetod som beskrivs här är en laboratoriemetod för undersökning av de potentiella långtidseffekter som en engångsexponering av jordbruksprodukter, och eventuellt även andra kemikalier, kan ha på jordlevande mikroorganismers omvandling av kol. Testmetoden grundar sig i huvudsak på rekommendationerna från Växtskyddsorganisationen för Europa och Medelhavsområdet (EPPO) (1). Även övriga riktlinjer har beaktats, till exempel riktlinjerna från Biologische Bundesanstalt i Tyskland (2), Environmental Protection Agency i USA (3) och SETAC (4). Vid en OECD-workshop om valet av jord och sediment i Belgirate, Italien, 1995 (5), kom man överens om hur många och vilka typer av jord som ska användas i detta test. Rekommendationerna för insamling, hantering och lagring av jordprover grundar sig på ISO-riktlinjer (6) och rekommendationer från workshopen i Belgirate.

Vid bedömning och utvärdering av olika ämnens toxiska egenskaper kan det vara nödvändigt att bestämma effekterna på den mikrobiella aktiviteten i jorden, till exempel när det behövs upplysningar om de potentiella bieffekter som växtskyddsprodukter kan ha på mikrofloran i jorden, eller när det är sannolikt att de jordlevande mikroorganismerna exponeras för andra kemikalier än växtskyddsprodukter. Testet rörande omvandling av kol görs för att bestämma sådana kemikaliers effekter på mikrofloran i jorden. Vid testning av jordbrukskemikalier (till exempel växtskyddsprodukter, gödselmedel och skogskemikalier) bör testet omfatta både omvandling av kol och omvandling av kväve. I fråga om övriga kemikalier räcker det att testa omvandling av kväve. När sådana kemikalier testas rörande omvandling av kväve och man får EC_{50}-värden som faller inom samma område som gäller för kommersiellt tillgängliga nitrifikationshämmande medel (till exempel nitrapyrin), kan man även göra test rörande omvandling av kol i syfte att få ytterligare upplysningar.

Jord består av levande och icke-levande komponenter som förekommer i komplexa och heterogena sammansättningar. Mikroorganismerna spelar en viktig roll för nedbrytning och omvandling av organiskt material i fertila jordar. Det finns många olika arter och dessa bidrar till de olika aspekter som gäller för jordens fertilitet. Långvariga störningar av dessa biokemikaliska processer kan även störa kretsloppet av näringsämnen, vilket i sin tur kan leda till förändringar av jordens fertilitet. Omvandling av kol och kväve sker i alla fertila jordar. Även om de mikrobsamhällen som utför dessa processer varierar från jord till jord, följer omvandlingen i huvudsak samma mönster.

▼B

Syftet med den testmetod som beskrivs här är att upptäcka skadliga långtidseffekter som ett ämne kan ha på omvandlingen av kol i aerob ytjord. Testet är känsligt för förändringar i storlek och aktivitet hos de mikrobsamhällen som svarar för omvandlingen av kol, eftersom de genom testet utsätts för både kemisk stress och kolsvält. För testet används sandhaltig jord med låg halt organiskt material. Jorden behandlas med testämnet och inkuberas under betingelser som möjliggör snabb mikrobiell metabolism. Under sådana betingelser sker en snabb utarmning av jordens innehåll av lättillgängligt kol. Detta leder till kolbrist som dödar mikrobcellerna och inducerar en viloperiod och/eller sporbildning. Om testet körs under en längre tid än 28 dagar kan summan av dessa reaktioner mätas i de obehandlade jordprovema som en progressiv minskning av metaboliskt aktiv mikrobiell biomassa (7). Om biomassan i en kolstressad jord påverkas av en kemikalie under de betingelser som råder under testet, återställs den eventuellt inte till samma nivå som i ett obehandlat jordprov. Störningar som testämnet har orsakat vid någon försökstidpunkt varar då ofta till slutet av testet.

De test som har använts som grund för denna testmetod är primärt utformade för situationer där den mängd ämne som når jorden kan förutses. Så är fallet till exempel för växtskyddsprodukter där man känner till den mängd som har applicerats på en åker. För jordbrukskemikalier räcker det med att testa två sådana doser som är relevanta med tanke på den förväntade applicerade mängden. Jordbrukskemikalier kan testas med avseende på aktiva ämnen eller produktsammansättningar. Testet är dock inte begränsat till kemikalier med förutsägbara halter i miljön. Genom att ändra både mängderna testämne som tillförs jorden och metoderna för utvärdering av data, kan testet även användas för situationer där mängden kemikalie som förväntas nå jorden inte är känd. På så sätt kan man i fråga om andra kemikalier än jordbrukskemikalier bestämma effekterna av en serie koncentrationer på omvandlingen av kol. Erhållna testdata används för att rita upp en dos-responskurva och beräkna EC_x-värden, där x är den procentuella effekten.

1.2 DEFINITIONER

Omvandling av kol: Nedbrytning av organiskt material genom inverkan av mikroorganismer under bildning av slutprodukten koldioxid.

EC_X (effektiv koncentration): Den koncentration av testämnet i jorden som leder till att omvandlingen av kol till koldioxid hämmas till x procent.

EC_{50} (median effektiv koncentration): Den koncentration av testämnet i jorden som leder till att omvandlingen av kol till koldioxid hämmas till 50 procent.

1.3 REFERENSÄMNEN

Inga.

▼B

1.4 PRINCIP FÖR TESTMETODEN

Siktad jord behandlas med testämnet eller lämnas obehandlad (kontrollprov). Vid testning av jordbrukskemikalier rekommenderas minst två testkoncentrationer, och dessa bör väljas med beaktande av den högsta koncentration som kan förväntas nå jorden. Efter inkubation under 0, 7, 14 och 28 dagar blandas de behandlade och obehandlade proverna med glukos, och den glukosinducerade respirationen i varje prov mäts under 12 på varandra följande timmar. Respirationen uttrycks som mängden frigjord koldioxid (mg koldioxid/kg torrvikt jord/h) eller mängden förbrukat syre (mg syre/kg jord/h). Den genomsnittliga respirationen i de behandlade jordproverna jämförs med situationen i kontrollproverna, och den procentuella avvikelsen från kontrollprovet beräknas. Alla test bör omfatta minst 28 dagar. Om skillnaderna mellan behandlade och obehandlade prover är minst 25 % dag 28 görs fortsatta bestämningar med 14 dagars intervall under en period som maximalt sträcker sig till dag 100. Vid testning av andra kemikalier än jordbrukskemikalier appliceras en serie koncentrationer av testämnet i jordprover, och efter 28 dagar bestäms den glukosinducerade respirationen (de genomsnittliga mängderna bildad koldioxid eller förbrukat syre). Resultaten från test med en serie koncentrationer analyseras med hjälp av en regressionsmodell och relevanta EC_x-värden beräknas (till exempel EC_{50}, EC_{25} och/eller EC_{10}). Se definitionerna.

1.5 TESTETS GILTIGHET

Utvärderingen av testresultat rörande jordbrukskemikalier baserar sig på relativt små skillnader (till exempel medelvärde ±25 %) mellan frigjord koldioxid eller förbrukat syre i (eller av) obehandlade och behandlade jordprover. Därför kan stora variationer i de obehandlade proverna leda till falska resultat. Variationen mellan obehandlade replikatprover bör därför vara mindre än ± 15 %.

1.6 BESKRIVNING AV TESTMETODEN

1.6.1 **Utrustning**

Provbehållarna bör vara tillverkade av kemiskt inert material. Deras volym bör anpassas till det förfarande som används för inkubation av jorden, till exempel inkubation som bulk eller som en serie individuella jordprover (se avsnitt 1.7.1.2). Det är viktigt att minimera vattenförlusterna och sörja för gasväxling under testets förlopp (provbehållarna kan till exempel täckas med perforerad polyetylenfilm). Vid testning av flyktiga ämnen bör förseglingsbara och gastäta behållare användas. Behållarnas storlek bör anpassas så att jordprovet upptar cirka en fjärdedel av behållarens volym.

För bestämning av glukosinducerad respiration krävs inkubationssystem och instrument för mätning av producerad koldioxid eller förbrukat syre. Exempel på sådana system och instruments finns i litteraturen (8) (9) (10) (11).

1.6.2 **Valet av jord och antal jordtyper**

Endast en typ av jord används. Följande rekommendationer gäller för jorden:

— Sandhalt: minst 50 % och högst 75 %.

▼B

— pH: 5,5–7,5.

— Halten organiskt kol: 0,5–1,5 %.

— Den mikrobiella biomassan bör bestämmas (12) (13) och dess kolhalt bör vara minst 1 % av jordens totala organiska kol.

I de flesta fall utgör jord med dessa egenskaper ett exempel på sämsta möjliga situation – adsorptionen av testämnet är minimal, medan mikrofloran har maximal tillgång till testämnet. Det betyder att det i regel inte behövs test med andra typer av jord. I vissa fall, till exempel där testämnet mestadels förväntas hamna i särskilda jordar såsom sura skogsjordar eller om testämnet består av elektrostatiskt laddade kemikalier, kan det vara nödvändigt att använda en extra jordtyp.

1.6.3 **Insamling och lagring av jordprover**

1.6.3.1 *Insamling*

Man bör ha tillgång till detaljerade upplysningar om historian för den plats där testjorden tas. Upplysningarna bör omfatta exakt läge, växtlighetstäcke, datum för behandlingar med växtskyddsprodukter, behandlingar med organiska och oorganiska gödselmedel, tillförsel av biologiska material eller oavsiktlig förorening. Den plats som väljs för provtagningen bör vara lämpad för långtidsanvändning. Lämpliga platser är flerårig ängsmark, åkrar med ettåriga spannmålsgrödor (utom majs) och tättsådda grönbeten. Vid provtagningstidpunkten måste det ha gått minst ett år från en eventuell behandling av provtagningsplatsen med växtskyddsprodukter. Det bör även ha gått minst sex månader från tillförsel av organiska gödselmedel. Användning av mineralgödselmedel är godtagbar endast när detta sker med utgångspunkt från grödans behov. Jordprover får inte tas förrän det har gått minst tre månader från gödslingen. Jord som har behandlats med gödselmedel med kända biocideffekter (till exempel kalciumcyanid) bör undvikas.

Provtagning bör undvikas under eller strax efter långa perioder (längre än 30 dagar) av torka eller vattenmättnad. På plöjd mark ska jordproverna tas på ett djup mellan 0 och 20 cm. På gräsmark (ängar) eller annan mark som plöjs sällan (minst en växtsäsong mellan varje plöjning) kan maximidjupet för provtagningen vara lite mer än 20 cm (till exempel 25 cm). Jordproverna ska transporteras i behållare, och temperaturbetingelser bör vara sådana att det inte finns risk för signifikanta förändringar av jordens ursprungliga egenskaper.

1.6.3.2 *Lagring*

De jordprover som används ska helst vara nytagna. Om lagring i laboratoriet inte kan undvikas kan jordproverna hållas i mörker vid 4 ± 2 °C under högst tre månader. Det är viktigt att lagringsbetingelserna är aeroba. Om jordprover tas från områden där marken är frusen under minst tre månader per år kan proverna lagras under högst sex månader vid –18 °C. Den mikrobiella biomassan hos lagrade jordprover bestäms före varje försök. Biomassans kolhalt bör vara minst 1 % av jordens totala kolhalt (se avsnitt 1.6.2).

▼B

1.6.4 **Hantering och beredning av jordprover som testas**

1.6.4.1 *Förinkubation*

För jordprover som har lagrats (se avsnitten 1.6.4.2 och 1.7.1.3) rekommenderas en förinkubation under 2–28 dagar. Under förinkubationen bör jordprovet ha samma temperatur och fukthalt som under själva testet (se avsnitten 1.6.4.2 och 1.7.1.3).

1.6.4.2 *Fysikalisk-kemiska egenskaper*

Stora föremål (till exempel stenar och växtdelar) avlägsnas manuellt ur jorden, som därefter siktas fuktig, utan att torkas alltför mycket, till en partikelstorlek som är högst 2 mm. Jordprovets fukthalt justeras med destillerat eller avjoniserat vatten till ett värde mellan 40 % och 60 % av den maximala vattenkapaciteten.

1.6.5 **Beredning av testämnet för applicering i jorden**

Testämnet appliceras i regel med hjälp av en vehikel. Som vehikel kan vatten användas (för vattenlösliga ämnen) eller ett inert fast material såsom fin kvartssand (partikelstorlek: 0,1–0,5 mm). Vätskeformiga vehiklar andra än vatten (till exempel organiska lösningsmedel såsom aceton och kloroform) bör undvikas eftersom de kan skada mikrofloran. Om sand används som vehikel kan den beläggas med testämnet upplöst eller suspenderat i ett lämpligt lösningsmedel. Lösningsmedlet avlägsnas därefter genom avdunstning innan den belagda sanden blandas i jorden. För en optimal fördelning av testämnet i jorden rekommenderas 10 g sand per kilogram jord (torrvikt). Kontrollproverna behandlas med lika stor mängd rent vatten eller ren kvartssand.

Vid testning av flyktiga kemikalier bör förluster under behandlingen minimeras. Likaså bör en homogen fördelning i jorden säkerställas (testämnet bör exempelvis injiceras på flera ställen i jorden).

1.6.6 **Testkoncentrationer**

Om testet gäller växtskyddsprodukter eller andra kemikalier med förutsägbara koncentrationer i miljön, bör minst två koncentrationer användas. Den lägre koncentrationen bör minst motsvara den maximimängd som i praktiken förväntas nå jorden, och den högre koncentrationen bör vara en multipel av den lägre koncentrationen. Vid beräkning av koncentrationerna för det testämne som tillförs jorden antas att upptaget är enhetligt ned till jorddjupet 5 cm och att bulkdensiteten är 1,5. Vid testning av jordbrukskemikalier som appliceras direkt på jorden eller kemikalier där den mängd som når jorden kan förutses, rekommenderas PEC-koncentrationen (Predicted Environmental Concentration) och en femfaldig koncentration av denna. Ämnen som förväntas bli applicerade i jorden flera gånger under en säsong bör testas vid koncentrationer som fås genom att multiplicera PEC-koncentrationen med det maximala antalet förväntade appliceringar. Den högsta testkoncentrationen bör dock inte överskrida mer än tiofaldigt den maximala koncentrationen vid en enskild applicering.

Vid testning av andra kemikalier än jordbrukskemikalier används en geometrisk serie med minst fem koncentrationer. Testkoncentrationerna bör täcka det område som behövs för att bestämma EC_x-värden.

▼B

1.7 TESTETS UTFÖRANDE

1.7.1 **Exponeringsbetingelser**

1.7.1.1 *Behandlade prover och kontrollprover*

Vid testning av jordbrukskemikalier delas jorden i tre delar med lika vikt. Två delar blandas med vehikel plus produkt och den tredje blandas med ren vehikel (kontrollprov). Minst tre replikat rekommenderas för behandlade respektive obehandlade jordprover. Vid testning av andra kemikalier än jordbrukskemikalier delas jorden i sex delar med lika vikt. Fem prover blandas med vehikel plus testämne och det sjätte provet blandas med ren vehikel. Tre replikat rekommenderas för behandlade prover respektive kontrollprov. Det är viktigt att säkerställa en homogen fördelning av testämnet i de behandlade jordproverna. Vid inblandningen bör kompaktering eller klumpbildning av jorden undvikas.

1.7.1.2 *Inkubation av jordprover*

Inkubationen av jordprover kan utföras på två olika sätt. Den kan göras med bulkprover av varje behandlat och obehandlat jordprov eller som en serie individuella och lika stora delprover av varje behandlat och obehandlat jordprov. Vid testning av flyktiga ämnen bör man dock alltid använda en serie individuella delprover. Vid inkubation i form av bulk bereds stora mängder av behandlade och obehandlade jordprover. Under testets gång tas behövligt antal delprover för analys. De mängder som bereds för behandlade och obehandlade jordprover beror på storleken hos de delprover som ingår, antalet replikat som används för analys och det förväntade antalet provtagningstillfällen. Jordprover som inkuberas i form av bulk bör blandas grundligt innan delprover tas. När jordprover inkuberas i form av en serie individuella prover, delas varje behandlat och obehandlat prov upp i behövligt antal delprover som därefter används på planerat sätt. Om det är sannolikt med fler än två provtagningstillfällen bör tillräckligt antal delprover beredas med tanke på alla replikat och alla provtagningsgånger. Minst tre replikatprover av testjorden bör inkuberas under aeroba betingelser (se avsnitt 1.7.1.1). Alla testbehållare som används bör ha ett tillräckligt utrymme ovanför vätskeytan för att det inte ska uppstå anaeroba betingelser. Vid testning av flyktiga ämnen bör testet alltid göras med en serie individuella delprover.

1.7.1.3 *Testbetingelser och testperiodens längd*

Testet genomförs i mörker vid en rumstemperatur på 20 ± 2 °C. Under testets gång bör jordprovernas fukthalt upprätthållas vid 40–60 % av jordens maximala vattenkapacitet (se avsnitt 1.6.4.2). Tillåten variation är ± 5 %. Destillerat eller avjoniserat vatten kan tillföras vid behov.

Testet bör omfatta en period på minst 28 dagar. Vid testning av jordbrukskemikalier jämförs mängderna koldioxid som frigörs eller syre som förbrukas i behandlade och obehandlade prover. Om avvikelsen är högre än 25 % dag 28, förlängs testet tills skillnaden är högst 25 % eller tills testet har varat 100 dagar, beroende på vilken gräns som nås först. För andra kemikalier än jordbrukskemikalier avslutas testet efter 28 dagar. Dag 28 bestäms mängderna frigjord koldioxid eller förbrukat syre i behandlade jordprover och kontrollprover och EC_X-värden beräknas.

▼B

1.7.2 **Provtagning och analys av jordprover**

1.7.2.1 *Provtagningsschema*

Vid testning av jordbrukskemikalier analyseras jordproverna med avseende på glukosinducerad respiration dag 0, 7, 14 och 28. Om testperioden måste förlängas görs tilläggsbestämningarna med 14 dagars intervall efter dag 28.

Vid testning av andra kemikalier än jordbrukskemikalier används minst fem testkoncentrationer, och jordproverna analyseras med avseende på glukosinducerad respiration i början (dag 0) och i slutet av exponeringsperioden (dag 28). En delbestämning kan göras till exempel dag 7 om det bedöms vara nödvändigt. De resultat som erhålls dag 28 används för att bestämma EC_x-värdet för kemikalien. Enligt val kan data rörande kontrollproverna från dag 0 användas för att uppskatta de ursprungliga mängderna metaboliskt aktiv mikrobiell massa i jorden (12).

1.7.2.2 *Bestämning av glukosinducerad respiration*

Den glukosinducerade respirationen bestäms för varje behandlat och obehandlat replikat och för varje provtagningstidpunkt. Jordproverna blandas med en glukosmängd som är tillräcklig för att framkalla en omedelbar och maximal respirationsrespons. Den mängd glukos som behövs för att framkalla en maximal respirationsrepons i en given jordtyp kan bestämmas genom ett preliminärt test som utförs med en serie glukoskoncentrationer (14). För sandhaltig jord med 0,5–1,5 % organiskt kol är det i regel tillräckligt med 2–4 g glukos per kg jord (torrvikt). Glukosen kan malas till pulver med ren kvartssand (10 g sand/kg torrvikt jord) och blandas sedan homogent in i jorden.

Jordproverna med glukos inkuberas vid 20 ± 2 °C i ett system som är lämpligt för bestämning av respirationen. Bestämningen kan göras kontinuerligt, varje timme eller var annan timme (se avsnitt 1.6.1). Den koldioxid som frigörs eller det syre som förbrukas mäts under 12 på varandra följande timmar och mätningarna bör inledas så snart som möjligt (1–2 timmar) efter glukostillförseln. De totala mängderna frigjord koldioxid eller förbrukat syre under de 12 timmarna uppmäts och den genomsnittliga respirationen bestäms.

2 **DATA**

2.1 BEHANDLING AV RESULTATEN

Vid testning av jordbrukskemikalier registreras mängden frigjord koldioxid eller förbrukat syre i varje replikatprov, och medelvärdena för alla replikat ges i tabellform. De värden som erhålls utvärderas med lämpliga och allmänt godtagna statistiska metoder (till exempel F-test, 5 % signifikansnivå). De värden som erhålls för den glukosinducerade respirationen uttrycks som mg koldioxid/kg torrvikt jord/h eller mg syre/torrvikt jord/h. Den genomsnittliga koldioxidbildningen eller genomsnittliga syreförbrukningen jämförs med situationen i kontrollprovet och den procentuella avvikelsen från kontrollprovet beräknas.

▼B

Vid testning av andra kemikalier än jordbrukskemikalier bestäms mängderna frigjord koldioxid eller förbrukat syre i varje replikat, och en dos-responskurva ritas upp för uppskattningen av EC_x-värden. De värden som efter 28 dagar registreras för den glukosinducerade respirationen (mg koldioxid/kg torrvikt jord/h eller mg syre/torrvikt jord/h) i de behandlade proverna jämförs med motsvarande värden för kontrollprovet. Resultatet används för beräkning av den procentuella hämningen för varje testkoncentration. Dessa procentvärden ritas upp mot koncentrationen, och EC_x-värden beräknas därefter med hjälp av statistiska metoder. Konfidensgränserna (p = 0,95) för de beräknade EC_X-värdena bestäms med standardmetoder (15), (16), (17).

2.2 TOLKNING AV RESULTATEN

Om utvärderingen av testresultaten rörande jordbrukskemikalier visar att respirationen vid den lägre behandlingsnivån (den maximala förväntade koncentrationen) avviker från värdet vid kontrollnivån med högst 25 % vid alla provtagningstidpunkter efter dag 28, kan man anse att produkten inte har någon långtidseffekt på omvandlingen av kol i jord. Vid utvärdering av test rörande andra ämnen än jordbrukskemikalier används värden för EC_{50}, EC_{25} och/eller EC_{10}.

3. **RAPPORTERING**

TESTRAPPORT

Testrapporten ska innehålla nedan angivna uppgifter.

Fullständig identifiering av jorden, inbegripet

— platsens geografiska data (latitud, longitud),

— upplysningar om platsens historia (växtlighetstäcke, behandlingar med växtskyddsprodukter, behandlingar med gödselmedel, oavsiktlig förorening och dylikt),

— användningsmönster (till exempel jordbruksmark eller skog),

— provtagningsdjup (cm),

— halten sand/slam/lera (% torrvikt),

— pH (i vatten),

— halten organiskt kol (% torrvikt),

— halten kväve (% torrvikt),

— katjonbyteskapacitet (mmol/kg),

— mikrobiell biomassa angiven som procentandel av totalt organiskt kol,

— vilka metoder som har använts för bestämning av varje parameter,

— alla upplysningar som hör samman med insamling och lagring av jordproverna,

— detaljupplysningar om eventuell förinkubation av jorden.

▼B

Testämne:

— fysikalisk natur och relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper,

— kemiska identifieringsdata med angivelse av, där det är relevant, strukturformel, renhetsgrad (för växtskyddsprodukter procentandelen aktivt ämne), kvävehalt.

Testbetingelser:

— detaljupplysningar om förbättring av jorden med organiskt substrat,

— antalet koncentrationer av testkemikalien och, där det är relevant, motivering för de valda koncentrationerna,

— detaljupplysningar om hur testämnet har tillförts jorden,

— inkubationstemperatur,

— jordens fukthalt vid testets början och under testets gång,

— inkubationsmetod (som bulk eller som en serie individuella delprover),

— antalet replikat,

— provtagningstidpunkter.

Resultat:

— metod och utrustning som har använts för respirationsbestämningar,

— data i tabellform, inbegripet enskilda och genomsnittliga värden för mängderna koldioxid eller syre,

— variationen mellan replikaten i behandlade prover och kontrollprover,

— redogörelse för justeringar som har gjorts vid beräkningarna (om relevant),

— den procentuella variationen för glukosinducerad respiration vid varje provtagningstidpunkt eller, där det är relevant, EC_{50}-värde med 95 procents konfidensgräns, övriga EC_x-värden (till exempel EC_{25} eller EC_{10}) med konfidensintervall och en dos-responskurva,

— statistisk bearbetning av resultaten, i tillämpliga fall,

— alla upplysningar och observationer som kan vara till nytta vid tolkningen av resultaten.

4. **HÄNVISNINGAR**

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 (andra utgåvan, 1990).

3. EPA (1987), ”Soil Microbial Community Toxicity Test. EPA 40 CFR Part 797.3700. Toxic Substances Control Act Test Guidelines; Proposed rule”, den 28 september 1987.

▼B

4. SETAC-Europe (1995), ”Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides”, red. M. R. Lynch, *Pub. SETAC-Europe,* Bryssel.

5. OECD (1995), ”Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments”, Belgirate, Italien, den 18–20 januari 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”, i ”Pesticide Effects on Soil Microflora”, red. L. Somerville och M.P. Greaves, kap 3, 45–60.

8. Anderson, J.P.E. (1982), ”Soil Respiration”, i ”Methods of Soil Analysis – Part 2: Chemical and Microbiological Properties”, *Agronomy Monograph, 9,* red. A. L. Page, R. H. Miller och 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), ”Markundersökningar – Inkubationssystem för bestämning av mineraliseringen av organiska kemikalier i jord under aeroba förhållanden”.

11. O. Heinemeyer, H. Insam, E.A. Kaiser, och G. Walenzik (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), ”Markundersökningar – Bestämning av markens mikrobiella biomassa – Del 1: Sustratinducerad respirationsmetod”.

13. ISO 14240-2 (1997), ”Markundersökningar – Bestämning av markens mikrobiella biomassa – Del 2: Fumigering – extraheringsmetod”.

14. H. P. Malkomes, (1986), ”Einfluβ von Glukosemenge auf die Reaktion der Kurzzeit-Atmung im Boden Gegenüber Pflanzenschutzmitteln, Dargestellt am Beispiel eines Herbizide”, *Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd., Braunschweig,* 38, 113–120.

15. J.T. Litchfield, och F. Wilcoxon (1949), ”A simplified method of evaluating dose-effect – experiments”, *Jour. Pharmacol. and Exper. Ther.,* 96, 99–113.

(16) D.J. Finney, (1971), ”Probit Analysis”, tredje utgåvan, Cambridge, London och New York.

(17) D.J. Finney (1978), ”Statistical Methods in biological Assay”, Griffin, Weycombe, Förenade kungariket.

▼B

C.23 AEROB OCH ANAEROB OMVANDLING I JORD

1. METOD

Denna testmetod är i stort sett identisk med OECD TG 307 (2002).

1.1 INLEDNING

Testmetoden baserar sig på befintliga riktlinjer (1), (2), (3), (4), (5), (6), (7), (8), (9). Den testmetod som beskrivs här är avsedd för utvärdering av aerob och anaerob omvandling av kemikalier i jord. Bestämningar görs av i) testämnets omvandlingshastighet och ii) karaktären och hastigheterna för bildning och minskning av de omvandlingsprodukter som växter och jordlevande organismer kan exponeras för. Sådana undersökningar behövs för kemikalier som appliceras direkt i jorden eller sannolikt kommer att nå jorden. Resultaten kan också användas för att utarbeta provtagnings- och analysprotokoll för relaterade fältstudier.

För bedömning av omvandlingsmönstren är det i regel tillräckligt med aeroba och anaeroba undersökningar av endast en jordtyp (8), (10), (11). Omvandlingshastigheterna bör bestämmas i minst tre ytterligare jordtyper (8), (10).

Vid en OECD-workshop om valet av jord och sediment som hölls i Belgirate, Italien, 1995 (10), kom man särskilt överens om hur många och vilka typer av jord som ska användas i detta test. De jordtyper som testas bör vara representativa för de miljöbetingelser där användning eller utsläpp förväntas ske. Exempelvis kemikalier som sannolikt kommer att släppas ut i subtropiska till tropiska klimat bör testas med jordmåner i klasserna Ferrasoler eller Nitosoler (FAO-systemet). Workshopen i Belgirate gav också rekommendationer rörande insamling, hantering och lagring av jordprover, baserade på ISO-riktlinjer (15). Även användningen av jord för risodling behandlas i denna metod.

1.2 DEFINITIONER

Testämne: Alla ämnen, oavsett det gäller den ursprungliga föroreningen eller relevanta omvandlingsprodukter.

Omvandlingsprodukter: Alla ämnen som uppstår till följd av biotiska eller abiotiska omvandlingsreaktioner av testämnet, inbegripet CO_2 och produkter i bundna rester.

Bundna rester: Dessa är sådana föreningar i jorden, i växter eller i djur som blir kvar i matrisen i form av ursprungligt ämne eller dess metaboliter eller omvandlingsprodukter efter extraktion. Extraktionsmetoden får inte i avsevärd grad leda till ändringar i själva föreningarna eller matrisens struktur. Bindningens karaktär kan delvis klarläggas genom matrisstörande extraktionsmetoder och sofistikerade analysmetoder. Hittills har man på detta sätt kunnat identifiera till exempel kovalenta bindningar, jonbindningar och sorptiva bindningar samt inneslutning. Generellt sett innebär bildningen av bundna rester att biotillgängligheten blir signifikant mindre (12) (modifierat ur IUPAC 1984 (13)).

Aerob omvandling: Reaktioner som sker i närvaro av molekylärt syre (14).

▼B

Anaerob omvandling: Reaktioner som sker utan närvaro av molekylärt syre (14).

Jord: En blandning av mineraliska och organisk-kemiska beståndsdelar. De senare består av föreningar med hög kol- och kvävehalt samt hög molekylvikt. Dessa föreningar påverkas av små organismer (nästintill mikroorganismer). Jord kan hanteras i två olika tillstånd:

a) Ostörd, såsom den har uppstått under tidens gång i karakteristiska skikt av ett flertal olika jordtyper.

b) Störd, vilket normalt gäller för odlad mark eller fall där jordprover tas genom grävning och därefter undersöks med denna testmetod (14).

Mineralisering: Det fullständiga sönderfallet av organiska föreningar till CO_2 och H_2O under aeroba betingelser samt till CH_4, CO_2 och H_2O under anaeroba betingelser. Med mineralisering avses här ett omfattande sönderfall som sker när en ^{14}C-märkt förening används och en märkt kolatom oxideras under frigörande av motsvarande mängd $^{14}CO_2$ (14).

Halveringstid: Betecknas med $t_{0,5}$ – den tid det tar för ett testämne att omvandlas till 50 % när omvandlingen kan beskrivas med kinetik av första ordningen. Denna tid är oberoende av koncentrationen.

DT_{50} (tid för försvinnande 50): Den tid inom vilken testämnets koncentration går ned med 50 %. Denna tid är inte samma som halveringstiden $t_{0,5}$ i fall där omvandlingen inte följer kinetik av första ordningen.

DT_{75} (tid för försvinnande 75): Den tid inom vilken testämnets koncentration går ned med 75 %.

DT_{90} (tid för försvinnande 90): Den tid inom vilken testämnets koncentration går ned med 90 %.

1.3 REFERENSÄMNEN

Referensämnen bör användas för karakterisering och/eller identifiering av omvandlingsprodukterna genom spektroskopiska och kromatografiska metoder.

1.4 TESTETS TILLÄMPBARHET

Metoden kan tillämpas på alla kemiska ämnen (omärkta eller radioaktivt märkta) för vilka det finns tillgång till en analysmetod som är tillräckligt exakt och känslig. Metoden kan tillämpas på föreningar som är i viss mån flyktiga, ickeflyktiga, vattenlösliga eller vattenolösliga. Testet bör inte tillämpas på kemikalier som är mycket flyktiga från jord (till exempel desinfektionsmedel, organiska lösningsmedel) och som därför inte hålls kvar i jorden under de försöksbetingelser som gäller för detta test.

▼B

1.5 UPPLYSNINGAR OM TESTÄMNET

Omärkta eller märkta testämnen kan användas för bestämning av omvandlingshastigheten. Märkt material behövs för undersökning av omvandlingsmönstret och för bestämning av en massbalans. C-märkning rekommenderas, även om andra isotoper, såsom ^{13}C, ^{15}N, ^{3}H och ^{32}P kan användas. Märkningen bör om möjligt finnas i molekylens mest stabila del(ar) ([1]). Testämnets renhetsgrad bör vara minst 95 %.

Innan test rörande aerob och anaerob omvandling i jord utförs bör följande upplysningar om testämnet finnas tillgängliga:

a) löslighet i vatten (metod A.6),

b) löslighet i organiska lösningsmedel,

c) ångtryck (metod A.4) och Henrys lag-konstant,

d) fördelningskoefficient n-oktanol/vatten (metod A.8),

e) kemisk stabilitet i mörker (hydrolys) (metod C.7),

f) pK_a om en molekyl är benägen till protonering eller deprotonering (OECD-riktlinje 112) (16).

Det kan även vara till nytta att känna till exempelvis testämnets toxicitet för jordlevande mikroorganismer (testmetoderna C.21 och C.22)(16).

Det bör finnas tillgång till analysmetoder (inbegripet extraktions- och reningsmetoder) för kvantifiering och identifiering av testämnet och dess omvandlingsprodukter.

1.6 PRINCIP FÖR TESTMETODEN

Jordproverna behandlas med testämnet och inkuberas i mörker i flaskor av biometertyp eller i genomflödessystem under kontrollerade laboratoriebetingelser (konstant temperatur och jordfuktighet). Efter lämpliga tidsintervall extraheras jordproverna och analyseras med avseende på det ursprungliga ämnet och dess omvandlingsprodukter. Flyktiga produkter samlas upp med hjälp av lämplig absorptionsutrustning. Med hjälp av C-märkt material kan de olika mineraliseringshastigheterna av testämnet bestämmas genom att den $^{14}CO_2$ som bildas fångas upp. Därefter kan en massbalans som inbegriper bildningen av jordbundna rester upprättas.

1.7 KVALITETSKRITERIER

1.7.1 **Utbyte**

Extraktion och analys av minst dubbla jordprover omedelbart efter tillförsel av testämnet ger en första indikation på analysmetodens repeterbarhet och enhetligheten hos det förfarande som har använts för tillförsel av testämnet. Utbyten för senare stadier av försöken erhålls genom massbalanserna. Utbytena bör vara 90–110 % för radioaktivt märkta kemikalier (8) och 70–110 för omärkta kemikalier (3).

([1]) Om testämnet till exempel innehåller en ring måste märkningen finnas på denna ring. Om testämnet innehåller två eller flera ringar kan det vara nödvändigt med separata undersökningar för utvärdering av vad som händer med de enskilda ringarna och för att få lämpliga upplysningar om bildningen av omvandlingsprodukter.

▼B

1.7.2 **Analysmetodens repeterbarhet och känslighet**

Analysmetodens repeterbarhet (med undantag av den initiala extraktionseffektiviteten) när det gäller att kvantifiera testämnet och omvandlingsprodukterna kan kontrolleras genom en duplikatanalys av samma extrakt ur jorden, som bör ha inkuberats tillräckligt länge för att omvandlingsprodukter ska ha bildats.

Analysmetodens detektionsgräns (LOD) för testämnet och för omvandlingsprodukterna bör vara minst 0,01 mg· kg^{-1} jord (som testämne) eller 1 % av den tillförda dosen, beroende på vilket värde som är lägre. Likaså bör kvantifieringsgränsen (LOQ) anges.

1.7.3 **Noggrannheten hos omvandlingsdata**

Genom regressionsanalys av testämneskoncentrationerna som en funktion av tiden fås ungefärliga upplysningar om omvandlingskurvans tillförlitlighet och en möjlighet att beräkna konfidensgränserna för halveringstiderna (när det gäller kinetik av pseudoförsta ordningen) eller DT_{50}-värden och, om tillämpligt, värden för DT_{75} och DT_{90}.

1.8 BESKRIVNING AV TESTMETODEN

1.8.1 **Utrustning och kemiska reagenser**

Inkubationssystemet kan vara ett statiskt slutet system eller ett lämpligt genomflödessystem (7), (17). Exempel på ett lämplig genomflödessystem för inkubation av jord och på flaskor av biometertyp finns i figur 1 respektive figur 2. Båda typerna av inkubationssystem har sina fördelar och begränsningar (7), (17).

Dessutom behövs normal laboratorieutrustning, särskilt följande:

— Instrument för analysmetoder såsom gas-vätskekromatografi (GLC), högtrycksvätskekromatografi (HPLC), tunnskiktskromatografi (TLC), inbegripet tillbörliga detektionssystem för analys av radioaktivt märkta eller omärkta ämnen eller metod med invers isotoputspädning.

— Instrument för identifiering (till exempel genom masspektrometri, GC-masspektrometri, HPLC-masspektrometri, kärnmagnetisk resonans (NMR)).

— Vätskeskintillationsräknare.

— Oxidationsmedel för förbränning av radioaktivt material.

— Centrifug.

— Extraktionsapparatur (till exempel centrifugrör för kallextraktion och Soxhlet-apparatur för kontinuerlig extration med återflöde).

— Utrustning för koncentrering av lösningar och extrakt (till exempel roterande evaporator).

— Vattenbad.

— Mekanisk blandare (till exempel knådningsmaskin eller roterande mixer).

▼B

Kemiska reagenser, till exempel följande:

— NaOH, p.a. kvalitet, 2 mol dm^{-3} eller annan lämplig bas (till exempel KOH, etanolamin).

— H_2SO_4, p.a kvalitet, 0,05 mol dm^{-3}.

— Etylenglykol, p.a. kvalitet.

— Fasta absorptionsmaterial såsom kalk- och polyuretanproppar.

— Organiska lösningsmedel (p.a. kvalitet), exempelvis aceton eller metanol.

— Skintillationsvätska.

1.8.2 **Tillförsel av testämnet**

Innan testämnet tillförs och fördelas i jorden kan det lösas upp i vatten (avjoniserat eller destillerat) eller vid behov i minsta möjliga mängd aceton eller något annat organiskt lösningsmedel (6) i vilket testämnet är tillräckligt lösligt och stabilt. Den mängd lösningsmedel som används får dock inte ha betydande inverkan på jordens mikrobiella aktivitet (se avsnitten 1.5 samt 1.9.2 och 1.9.3). Lösningsmedel som hämmar den mikrobiella aktiviteten, såsom kloroform, diklormetan och andra halogenerade lösningsmedel, bör undvikas.

Testämnet kan också tillföras i fast form, till exempel inblandat i kvartssand (6) eller i ett litet delprov av testjorden som har lufttorkats och steriliserats. Om testämnet tillförs med hjälp av lösningsmedel måste detta få avdunsta innan det spikade delprovet tillförs det ursprungliga icke-sterila jordprovet.

För allmänna kemikalier, vars som huvudsakligen når jorden genom applicering av avloppsslam eller jordbruksprodukter, bör testämnet först tillföras slammet som därefter blandas i jordprovet (se avsnitten 1.9.2 och 1.9.3).

Användningen av formulerade produkter rekommenderas i regel inte. För svårlösliga testämnen kan dock användningen av formulerat material vara ett lämpligt alternativ.

1.8.3 **Jord**

1.8.3.1 *Valet av jord*

För bestämning av omvandlingsmönstret används en representativ jordtyp – sandy loam, silty loam, loam eller loamy sand (enligt FAO- och USDA-klassificeringen (18)), pH 5,5–8,0, halten organiskt kol 0,5–2,5 % och en mikrobiell biomassa som utgör minst 1 % av totala mängden organiskt kol (10).

Vid undersökning av omvandlingshastigheter behövs minst tre ytterligare jordtyper som representerar ett urval relevanta jordtyper. Jordtyperna bör vara sinsemellan olika i fråga om halten organiskt kol, pH, lerhalt och mikrobiell biomassa (10).

▼B

All jord bör karakteriseras minst med avseende på textur (% sand, % silt, % clay) (enligt FAO- och USDA-klassificering (18)), pH, katjonbyteskapacitet, organiskt kol, bulktäthet, vattenretentionsegenskaper ([1]) och mikrobiell biomassa (endast vid aeroba undersökningar). Tilläggsupplysningar om jordens egenskaper kan vara till nytta vid tolkning av resultaten. Jordens egenskaper kan bestämmas med de metoder som rekommenderas i hänvisningarna (19), (20), (21), (22), (23). Den mikrobiella biomassan bör bestämmas med SIR-metoden (substratinducerad respiration) (25), (26) eller alternativa metoder (20).

1.8.3.2 *Insamling, hantering och lagring ax jord*

Det bör finnas tillgång till detaljerade upplysningar om historian för den plats där testjorden tas. Upplysningarna bör omfatta exakt läge, växtlighetstäcke, behandlingar med kemikalier, behandlingar med organiska och oorganiska gödselmedel, tillförsel av biologiska material eller förorening. Om jorden har behandlats med testämnet eller ett strukturellt analogt ämne inom de fyra senaste åren bör den inte användas för undersökningar rörande omvandling (10), (15).

Jordproverna bör vara nytagna (från A-horisonten eller det översta 20 cm-skiktet) och ha en lämplig vattenhalt med tanke på siktning. För all annan jord än den från risfält bör provtagning undvikas under eller omedelbart efter långa perioder (mer än 30 dagar) av torka, frost eller översvämning (14). Proverna bör transporteras på sådant sätt att förändringar i vattenhalt minimeras. Under transporten bör proverna hållas i mörker med så fri tillgång till luft som det är möjligt. För detta ändamål är det i regel tillräckligt med en löst sluten polyetylenpåse.

Jordproverna bör bearbetas så snart som möjligt efter provtagningen. Först avlägsnas vegetation, större fauna och stenar och därefter får jorden passera ett 2 mm-sikt som fångar upp små stenar, fauna och växtrester. Omfattande torkning eller krossning av jorden före siktningen bör undvikas (15).

Om provtagningen försvåras under vintern (jorden är frusen eller snötäckt) kan proverna tas från en sats jord som har lagrats i växthus under ett växttäcke (till exempel gräs eller gräs–klöverblandning). Alla prover som undersöks bör helst vara nytagna. Om lagring av bearbetade jordprover inte kan undvikas före undersökningen måste betingelserna vara lämpliga och lagringstiden begränsad (4 ± 2 °C och högst tre månader) för att den mikrobiella aktiviteten ska upprätthållas ([2]). Närmare anvisningar om insamling, hantering och lagring av jordprover avsedda för undersökningar av bioomvandling finns i hänvisningarna (8), (10), (15), (26), (27).

([1]) Vattenretentionsegenskaperna hos jord kan mätas som fältkapacitet, vattenkapacitet eller tension (pF). Begreppsförklaringar finns i bilaga 1. I testrapporten bör anges om vattenretentionsegenskaperna och bulktätheten har bestämts i ostörda fältprover eller i störda (bearbetade) prover).

([2]) Färska forskningsresultat tyder på att jordprover från tempererade zoner även kan lagras vid -20 C under mer än tre månader (28), (29) utan betydande minskningar av den mikrobiella aktiviteten.

▼B

Innan ett bearbetat jordprov används för detta test bör provet förinkuberas för att framkalla groning och avlägsnande av frön, och för att återställa jämvikten för den mikrobiella metabolismen efter den ändring av betingelser som sker mellan provtagning eller lagring och inkubation. Det är i regel tillräckligt med en förinkubationsperiod vars längd är 2–28 dagar och vars temperatur- och fuktbetingelser är ungefär desamma som under det egentliga försöket (15). Lagrings- och förinkubationsperioden bör tillsammans inte vara längre än tre månader.

1.9 TESTETS UTFÖRANDE

1.9.1 **Testbetingelser**

1.9.1.1 *Testtemperatur*

Jordproverna bör under hela testperioden inkuberas i mörker vid en konstant temperatur som är representativ för de klimatförhållanden som råder på den plats där testämnet används eller släpps ut. Temperaturen 20 ± 2 °C rekommenderas för testämnen som kan nå jorden i tempererade klimat. Temperaturen bör övervakas.

För kemikalier som appliceras eller släpps ut i kallare klimat (till exempel i de nordiska länderna under hösten och vintern) bör extra jordprover även inkuberas vid en lägre temperatur (till exempel 10 ± 2 °C).

1.9.1.2 *Fukthalt*

För omvandlingstest som görs under aeroba betingelser bör jordens fukthalt ([1]) justeras till ett pF-värde mellan 2,0 och 2,5 och upprätthållas på denna nivå (3). Jordens fukthalt uttrycks som massan vatten per massan torr jord. Fukthalten bör regelbundet kontrolleras (till exempel med två veckors intervall) genom vägning av inkubationsflaskorna. Vattenförluster kompenseras genom att tillföra vatten (helst sterilfiltrerat kranvatten). När vatten tillförs är det viktigt att förebygga eller minimera förluster av testämnet eller omvandlingsprodukter som kan ske genom avdunstning eller fotonedbrytning (i förekommande fall).

Vid omvandlingstest som görs under anaeroba betingelser och risfältsbetingelser mättas jorden med vatten genom översvämning.

1.9.1.3 *Aeroba inkubationsbetingelser*

I genomflödessystem upprätthålls de aeroba betingelserna genom periodisk spolning eller kontinuerlig ventilering med fuktad luft. I biometerflaskorna upprätthålls luftväxlingen genom diffusion.

1.9.1.4 *Sterila aeroba betingelser*

För att få upplysningar om relevansen hos ett testämnes abiotiska omvandling kan jordproverna steriliseras (steriliseringsmetoder beskrivs i hänvisningarna 16 och 29), behandlas med sterilt testämne (till exempel så att lösningen tillförs genom ett sterilt filter) och luftas med fuktad steril luft (se avsnitt 1.9.1.3. När det gäller jord för risodling bör jord och vatten steriliseras, och inkubationen görs därefter enligt beskrivningen i avsnitt 1.9.1.6.

([1]) Jorden får inte vara för våt eller för torr med tanke på upprätthållande av tillbörlig luftning och näring för mikroflarn i jorden. De rekommenderade fukthalterna för optimal mikrobiell tillväxt är 40–60 % vattenkapacitet (WHC) och 0,1–0,33 bar (6). Det senare motsvarar pF-området 2,0–2,5. Typiska fukthalter för olika jordtyper anges i bilaga 2.

▼B

1.9.1.5 *Anaeroba inkubationsbetingelser*

För att etablera och upprätthålla anaeroba betingelser inkuberas jorden efter behandlingen med testämnet i aeroba betingelser under en period vars längd är 30 dagar, en halveringstid eller DT_{50} (beroende på vilken tid som är kortast). Därefter mättas jorden med vatten (1–3 cm vattenskikt) och inkubationssystemet spolas med en inert gas (till exempel kväve eller argon ([1]). Testsystemet måste vara utformat så att pH, syrehalt och redoxpotential kan bestämmas, och det måste innehålla uppfångare för flyktiga produkter. System av biometertyp måste vara slutna för att luftinträngning genom diffusion ska undvikas.

1.9.1.6 *Inkubationsbetingelser för ris*

Vid undersökning av omvandlingen i jord för risodling översvämmas jorden med ett vattenskikt på 1–5 cm och testämnet tillförs vattenfasen (9). Jorddjupet bör vara minst 5 cm. Systemet ventileras med luft på samma sätt som vid försök i aeroba betingelser. Vattenskiktets pH, syrehalt och redoxpotential bör övervakas och rapporteras. Före det egentliga försöket behövs en förinkubationsperiod på minst två veckor (se avsnitt 1.8.3.2).

1.9.1.7 *Testets varaktighet*

Försöken rörande hastighet och mönster bör normalt inte överskrida 120 dagar ([2]) (3), (6), (8). Det beror på att jordens mikrobiella aktivitet efter denna period sannolikt börjar minska med tiden, eftersom det gäller ett konstgjort laboratoriesystem som är isolerat och inte får naturlig påfyllning. Om det finns ett behov för att karakterisera minskningen av testämnet samt bildningen och minskningen av viktiga omvandlingsprodukter, kan försöksperioden förlängas (till exempel till 6 eller 12 månader) (8). Förlängda inkubationsperioder bör motiveras i testrapporten, som då även bör innehålla resultat från bestämningar av biomassa under och vid slutet av dessa perioder.

1.9.2 **Testets utförande**

Omkring 50–200 g jord (torrvikt) placeras i varje inkubationsflaska (se figurerna 1 och 2 i bilaga 3), och jorden behandlas med testämnet genom en av de metoder som beskrivs i avsnitt 1.8.2. Om organiska lösningsmedel används för tillförsel av testämnet bör lösningsmedlet avlägsnas från jorden genom avdunstning. Jorden blandas grundligt med en spatel och/eller genom att skaka flaskan. Om försöket görs under risfältsbetingelser, bör jord och vatten blandas grundligt efter tillförseln av testämnet. Små delprover (till exempel 1 g) av den behandlade jorden bör analyseras med avseende på testämnet för att kontrollera att fördelningen är jämn. En alternativ metod beskrivs nedan.

([1]) Aeroba betingelser är dominerande i ytjord och även i jord under ytan, såsom visas i ett forskningsprojekt som fått stöd från EU (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. Enxironm. Aspects Pesticides Microbiol.,* 270–277, den 17–21 augusti 1992, Sigtuna, Sverige). Anaeroba betingelser förekommer endast sporadiskt vid översvämningar efter skyfall eller när risfältsbetingelser etableras i risfält.

([2]) Aeroba försök kan avslutas mycket tidigare, förutsatt att omvandlingsmönstret och mineraliseringen med säkerhet har nått sin absoluta slutpunkt vid försökets slut. Det är möjligt att avsluta testet efter 120 dagar eller när minst 90 % av testämnet har omvandlats, dock endast om minst 5 % CO_2 har bildats.

▼B

Tillförseln av testämne bör motsvara den högsta dosen som anges i bruksanvisningen för en växtskyddsprodukt, och en jämn tillförsel till ett lämpligt djup i åkern (till exempel 10 cm av det översta jordskiktet ([1]). Till exempel för kemikalier som appliceras på bladen eller på jorden, utan att blandas ned i jorden, är 2,5 cm ett lämpligt djup för beräkning av hur mycket kemikalie som bör tillföras varje flaska. För kemikalier som tillförs in i jorden används det djup som anges i produktens bruksanvisning. För allmänna kemikalier bör dosen uppskattas enligt den mest relevanta tillförselvägen. Om till exempel den viktigaste tillförselvägen till jorden är via avloppsslam, bör kemikalien doseras i slammet i sådan mängd att koncentrationen motsvarar den förväntade koncentrationen i det slam som används på åkern, och den mängd slam som tillförs testjorden ska motsvara det som normalt tillförs jordbruksjordar. Om denna koncentration inte är tillräckligt hög för att det ska vara möjligt att identifiera de viktigaste omvandlingsprodukterna kan man försöka med att inkubera separata jordprover som innehåller högre halter. Mycket höga halter som påverkar jordens mikrobiella funktioner bör dock undvikas (se avsnitten 1.5 och 1.8.2).

Alternativt kan en större jordsats (till exempel 1–2 kg) behandlas med testämnet. Satsen blandas därefter omsorgsfullt i en lämplig blandare och överförs i mindre portioner (50–200 g) till inkubationsflaskorna (till exempel med hjälp av provfördelare). Små delprover (till exempel 1 g) av den behandlade jordsatsen bör analyseras med avseende på testämnet för att kontrollera att fördelningen är jämn. Detta förfarande rekommenderas eftersom det ger möjlighet till en jämnare fördelning av testämnet i jorden.

Även obehandlade jordprover inkuberas under samma betingelser (aeroba) som de prover som har behandlats med testämnet. Proverna används för bestämningar av biomassa under och vid slutet av försöken.

När testämnet tillförs jorden upplöst i organiskt lösningsmedel bör jordprover som har behandlats med samma mängd lösningsmedel inkuberas under samma betingelser (aeroba) som gäller för de prover som har behandlats med testämnet. Dessa prover används för bestämning av biomassan i början, under och i slutet av undersökningen, i syfte att kontrollera lösningsmedlets inverkan på den mikrobiella massan.

Behållarna som innehåller behandlat jordprov monteras i ett genomflödessystem av det slag som beskrivs i figur 1 eller försluts med en absorptionskolonn av det slag som visas i figur 2 (se bilaga 3).

([1]) Den ytbaserade initialkoncentrationen beräknas med följande ekvation:

$$C_{soil}[mg/kg_{soil}] = \frac{A[kg/ha] \cdot 10^6[mg/kg]}{l[m] \cdot 10^4[m^2/ha] \cdot d[kg_{soil}/m^3]}$$

C_{soil} = Initialkoncentration i jorden (mg· kg^{-1})
A = Dosering (kg· ha^{-1}), l = jordskiktets tjocklek (m),
d = bulktäthet för torr jord (kg· m^{-3}).
Som en tumregel gäller att en dosering som är 1 kg· ha^{-1} ger en koncentration i jorden som ligger kring 1 mg· kg^{-1} i ett 10 cm skikt (när bulktätheten är 1 g cm^{-3}).

▼B

1.9.3 **Provtagning och mätning**

Dubbla inkubationsflaskor tas ur systemet med lämpliga intervall, jordproverna extraheras med lämpliga lösningsmedel med olika polaritet och analyseras därefter med avseende på testämnet och/eller omvandlingsprodukter. Ett välplanerat test ska omfatta så många flaskor att två flaskor kan tas ur systemet vid varje provtagningstillfälle. Likaså avlägsnas absorptionslösningar eller fasta absorptionsmaterial med olika intervall (7 dagars intervall under den första månaden och därefter 17 dagars intervall) under och i slutet av inkubationsperioden för varje jordprov, och analyseras med avseende på flyktiga produkter. Utöver ett jordprov som tas direkt efter tillförseln (dag 0) bör testet omfatta minst 5 ytterligare provtagningstillfällen. Tidsintervallerna bör väljas på sådant sätt att mönstret för minskningen av testämnet och mönstren för bildning och minskning av omvandlingsprodukter kan bestämmas (till exempel 0, 1, 3, 7 dagar, 2, 3 veckor, 1, 2, 3 månader).

Vid användning av ^{14}C-märkt testämne kvantifieras icke-extraherbar radioaktivitet genom förbränning och en massbalans beräknas för varje provtagningsintervall.

När det gäller anaerob inkubation och risfältsinkubation analyseras jord- och vattenfasema tillsammans med avseende på testämnet och omvandlingsprodukter, eller separeras genom filtrering eller centrifugering före extraktion och analys.

1.9.4 **Valfria tilläggstest**

Aeroba, icke-sterila undersökningar vid ytterligare temperaturer och jordfukthalter kan vara till hjälp för uppskattningen av temperaturens och fukthaltens inverkan på omvandlingshastigheten i jord för ett testämne och/eller dess omvandlingsprodukter.

Man kan även försöka få en närmare karakterisering av den icke-extraherbara radioaktiviteten till exempel med hjälp av superkritisk vätskeextraktion.

2. **DATA**

2.1 BEHANDLING AV RESULTATEN

Mängden testämne, omvandlingsprodukter, flyktiga ämnen (endast i %) och icke-extraherbara ämnen bör anges som procent av initialkoncentrationen för det tillförda ämnet och, där det är lämpligt, som $mg \cdot kg^{-1}$ jord (torrvikt) för varje provtagningsintervall. En massbalans bör anges som procent av initialkoncentrationen för det tillförda ämnet för varje provtagningsintervall. Med hjälp av en grafisk presentation av testämnets koncentration mot tiden kan halveringstiden för testämnets omvandling eller DT_{50} uppskattas. De viktigaste omvandlingsprodukterna bör identifieras och deras koncentrationer bör plottas mot tiden så att bildnings- och minskningshastigheterna kan bestämmas. En viktig omvandlingsprodukt är varje produkt som utgör > 10 % av den tillförda dosen vid varje tidpunkt medan undersökningen pågår.

De uppfångade flyktiga produkterna ger en viss indikation om testämnets och dess omvandlingsprodukters potentiella flyktighet ur jord.

▼B

Mer exakta bestämningar av halveringstiderna eller DT_{50} och, vid behov, DT_{75} och DT_{90} bör göras med hjälp av lämpliga beräkningar med kinetiska modeller. Värdena för halveringstid och DT_{50} bör rapporteras tillsammans med en beskrivning av vilken modell som har använts, vilken ordning av kinetik som har tillämpats och bestämningskoefficient (r^2. Första ordningens rekommenderas, utom om $r^2 <$ 0,7. Vid behov bör beräkningar även göras för viktiga omvandlingsprodukter. Exempel på lämpliga modeller beskrivs i hänvisningarna 31–35.

Om hastigheterna undersöks vid flera temperaturer bör omvandlingshastigheterna beskrivas som en funktion av temperaturen inom försökstemperaturintervallet. För detta används Arrhenius-förhållandet enligt följande formel.

$$k = A \cdot e^{-B/T} \text{ eller } \ln k = 1nA - \frac{B}{T},$$

där ln A och B är regressionskonstanter från skärningspunkten respektive lutningen för en anpassad linje som har erhållits genom linjär regression av ln k mot 1/T, där k är hastighetskonstanten vid temperaturen T och T är temperaturen uttryckt som grader Kelvin. Det är viktigt att notera att Arrhenius-förhållandet endast är giltigt inom ett begränsat temperaturområde i situationer där omvandlingen sker genom mikrobiell aktivitet.

2.2 UTVÄRDERING OCH TOLKNING AV RESULTATEN

Trots att undersökningarna görs i ett konstgjort system i laboratoriebetingelser, ger resultatet ändå en möjlighet att uppskatta testämnets omvandlingshastighet och omvandlingsprodukternas bildnings- och minskningshastighet i fältbetingelser (36), (37).

En undersökning av mönstret för omvandlingen av ett testämne ger upplysningar om hur ett ämne som tillförs jorden förändras strukturellt genom kemiska och mikrobiella reaktioner.

3. **RAPPORTERING**

TESTRAPPORT

Testrapporten ska innehålla följande:

Testämne:

— trivialnamn, kemiskt namn, CAS-nummer, strukturformel (med angivelse av märkningsposition om radioaktivt märkt material används) och relevanta fysikalkemiska egenskaper (se avsnitt 1.5),

— testämnets renhet (orenheter),

— strålningskemisk renhet hos märkta kemikalier och specifik aktivitet (vid behov).

Referenstämnen:

— kemiskt namn och struktur för referensämnen som används för karakterisering och/eller identifiering av omvandlingsprodukter.

Testjord:

— upplysningar om provtagningsstället,

— provtagningsdatum och -förfarande,

▼B

— jordens egenskaper, såsom pH, halten organiskt kol, textur (% sand, % silt, % clay), katjonbyteskapacitet, bulktäthet, vattenretentionsegenskaper och mikrobiell biomassa,

— hur länge jorden har lagrats och lagringsbetingelserna (i förekommande fall).

Testbetingelser:

— undersökningsdatum,

— mängden tillfört testämne,

— lösningsmedel som har använts och hur testämnet har tillförts,

— initialvikt hos det behandlade jordprovet och vikten hos varje prov som tas för analys,

— beskrivning av inkubationssystemet,

— luftflödeshastigheter (endast genomflödessystem),

— försökstemperatur,

— jordens fukthalt under inkubationen,

— mikrobiell biomassa i början, under och i slutet av de aeroba försöken,

— pH, syrehalt och redoxpotential i början, under och i slutet av anaeroba försök och risfältsförsök,

— extraktionsmetod(er),

— metoder för kvantifiering och identifiering av testämnet och viktiga omvandlingsprodukter i jorden och i absorptionsmaterial,

— antalet replikat och antalet kontrollprover.

Resultat:

— resultaten från bestämning av mikrobiell aktivitet,

— analysmetodens repeterbarhet och känslighet,

— utbyten (procentvärden för en valid undersökning anges i avsnitt 1.7.1),

— resultaten i tabellform, uttryckta som procentandel av initialdosen och, där det är lämpligt, som mg· kg^{-1} jord (torrvikt),

— massbalans under och i slutet av försöken,

— karakterisering av icke-extraherbar (bunden) radioaktivitet eller rester i jorden,

— kvantifiering av frigjord CO_2 och andra flyktiga föreningar,

— kurvor där koncentrationerna av testämnet och, i tillämpliga fall, viktiga omvandlingsprodukter i jorden har avsatts mot tiden,

— halveringstid eller DT_{50}, DT_{75} och DT_{90} för testämnet och, i tillämpliga fall, viktiga omvandlingsprodukter, inbegripet konfidensgränser,

▼B

— en uppskattning av abiotisk sönderfallshastighet under sterila betingelser,

— en bedömning av omvandlingskinetiken för testämnet och, i tillämpliga fall, för viktiga omvandlingsprodukter,

— förslag till omvandlingsmönster, där det är lämpligt,

— diskussion och tolkning av resultaten,

— rådata (till exempel kromatogram för prover, beräkningar av provernas omvandlingshastigheter och metoder som har använts för att identifiera omvandlingsprodukterna).

4. **HÄNVISNINGAR**

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. Europeiska unionen (EU) (1995), ”Kommissionens direktiv 95/36/EG av den 14 juli 1995 om ändring av rådets direktiv 91/414/EEG om utsläppande av växtskyddsprodukter på marknaden. Bilaga II, del A och bilaga III, del A: Omvandling, spridning och fördelning i miljön”.

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 fur 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), ”Markundersökningar – Inkubationssystem för bestämning av mineraliseringen av organiska kemikalier i jord under aeroba förhållanden”.

8. SETAC (1995), ”Procedures for Assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides”, Mark R. Lynch, red.

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, Italien, den 18–20 januari 1995.

11. J. A. Guth (1980), ”The study of transtbrmations. In Interactions between Herbicides and the Soil (R.J.Hance, red)”, *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” (antagen den 12 maj 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. Bilaga V till direktiv 67/548/EEG.

17. J. A. Guth (1981), ”Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil”, *Progress in Pesticide Biochemislry,* (red. D. H. Hutson, T. R. Roberts), J. Wiley & Sons, Vol I, 85–114.

18. Soil Texture Classification (US and FAO systems), *Weed Science, 33,* Suppl. 1 (1985) och *Soil Sci. Soc. Amer. Proc,* 26, 305(1962).

19. Methods of Soil Analysis (1986), ”Part 1, Physical and Mineralogical Methods” (red. A. Klute), *Agronomy Series, 9,* andra utgåvan.

20. Methods of Soil Analysis (1982), ”Part 2, Chemical and Microbiological Properties”, (red. A. L. Page, R. H. Miller och D.R. Kelney), *Agronomy Series,* 9, andra utgåvan.

21. ISO Standard Compendium Environment (1994), ”Soil Quality – General aspects; chemical and physical methods of analysis; biological methods of analysis”, första utgåvan.

22. E. Muckenhausen (1975), ”Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen”, *DLG-Verlag,* Frankfurt am Main.

23. F. Scheffer, P. Schachtschabel (1975), ”Lehrbuch der Bodenkunde”, F. Enke Verlag, Stuttgart.

24. J.P.E. Anderson, K. H. Domsch (1978), ”A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils”, *SoilBiol. Biochem.,* 10, 215–221.

25. ISO 14240-1 och 2 (1997). Markundersökningar – Bestämning av markens mikrobiella biomassa – Del 1: Sustratinducerad respirationsmetod. Del 2: Fumigering – extraheringsmetod.

26. J.P.E. Anderson (1987), ”Handling and storage of soils for pesticide experiments”, *Pesticide Effects on Soil Microflora,* (red. M. P. Somerville och Greaves), 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. O. Keuken, J.P.E. Anderson (1996), ”Influence of storage on biochemical processes in soil”, *Pesticides, Soil Microbiology and Soil Quality,* 59–63 (SETAC-Europa).

29. B. Stenberg, M. Johansson, M. Pel, K. Sjödahl-Svensson, J. Stenström, L. Torstensson (1996), ”Effect of freeze and cold storage of soil on microbial activities and biomass”, *Pesticides, Soil Microbiology and Soil Quality,* 68–9 (SETAC-Europa).

30. . Gennari, M. Negre, R. Ambrosoli (1987), ”Effects of ethylene oxide on soil microbial content and some chemical characteristics”, *Plant and Soil,* 102, 197–200.

31. J. P.E. Anderson (1975), ”Einfluss von Temperatur und Feuchte auf Verdampfung, Abbau und Festlegung von Diallat im Boden”, Z. *PflKrankh Pflschutz,* Sonderheft VII, 141–146.

▼B

32. J.W. Hamaker (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. C.A.I. Goring, D.A. Laskowski, J.W. Hamaker, R.W. Meikle (1975), ”Principles of pesticide degradation in soil”, *Environmental Dynamics of Pesticides,* (red. R. Haque och V.H. Freed), 135–172.

34. G. Timme, H. Frehse, V. Laska (1986), ”Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues”*II. Pflanzenschutz – Nachrichten Bayer,* 39, 188–204.

35. G. Timme, H. Frehse (1980), ”Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues”, *I. Pflanzenschutz – Nachrichten Bayer,* 33, 47–60.

36. D.I. Gustafson, L. R. Holden (1990), ”Non-linear pesticide dissipation in soil; a new model based on spatial variability”, *Environm. Sci. Technol.,* 24, 1032–1041.

37. K. Hurle, A. Walker (1980), ”Persistence and its prediction”, *Interactions between Herbicides and the Soil,* (red. R. J. Hance), *Academic Press,* 83–122.

▼B

Bilaga 1

TENSION, FÄLTKAPACITET (FC) OCH VATTENKAPACITET (WHC) [1]

Vattenpelarens höjd (cm)	pF [a]	bar [b]	Anmärkningar
10^7	7	10^4	Torr jord
$1{,}6 \cdot 10^4$	4,2	16	Permanent vissningsgräns
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 för fältkapacitet [d]
10^2	2	0,1	
60	1,8	0,06	
33	1,5	0,033	
10	1	0,01	WHC (ungefärligt värde)
1	0	0,001	Vattenmättad jord

[a] pF = logaritmen av cm vattenpelare.
[b] 1 bar= 10^5 Pa.
[c] Motsvarar en ungefärlig vattenhalt på 10 % i sand, 35 % i loam och 45 % i clay.
[d] Fältkapaciteten är inte konstant utan varierar enligt jordtyp mellan pF 1,5 och 2,5.

Tensionen mäts i cm vattenpelare eller i bar. På grund av det stora området för tensionen uttrycks den i praktiken som ett pF-värde som är ekvivalent med logaritmen av cm vattenpelare.

Fältkapaciteten definieras som den mängd vatten som en naturjord kan hålla mot gravitationen i två dagar efter en längre regnperiod eller efter tillräcklig bevattning. Den bestäms på platsen i ostörd jord. Denna bestämning kan således inte göras på störda jordprover i laboratorium. FC-värden som bestäms med störd jord kan uppvisa stora systematiska variationer

Vattenkapaciteten (WHC) bestäms i laboratoriet med ostörd och störd jord genom att mätta en jordkolonn med vatten genom transport genom kapillärkraft. WHC är särskilt användbar för störda jord och kan vara upp till 30 % högre än fältkapaciteten (1). Det är också försöksmässigt enklare att bestämma WHC än att få tillförlitliga FC-värden.

Noter

(1) E. Muckenhausen (1975), ”Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen”, DLG-Verlag, Frankfurt am Main.

▼B

Bilaga 2

JORDENS FUKTHALT (g vatten per 100 g torr jord) I OLIKA JORDTYPER FRÅN OLIKA LÄNDER

Jordtyp	Land	Jordens fukthalt vid		
		WHC ([1])	pF= 1,8	pF = 2,5
Sand	Tyskland	28,7	8,8	3,9
Loamy sand	Tyskland	50,4	17,9	12,1
Loamy sand	Schweiz	44,0	35,3	9,2
Silt loam	Schweiz	72,8	56,6	28,4
Clay loam	Brasilien	69,7	38,4	27,3
Clay loam	Japan	74,4	57,8	31,4
Sandy loam	Japan	82,4	59,2	36,0
Silt loam	USA	47,2	33,2	18,8
Sandy loam	USA	40,4	25,2	13,3

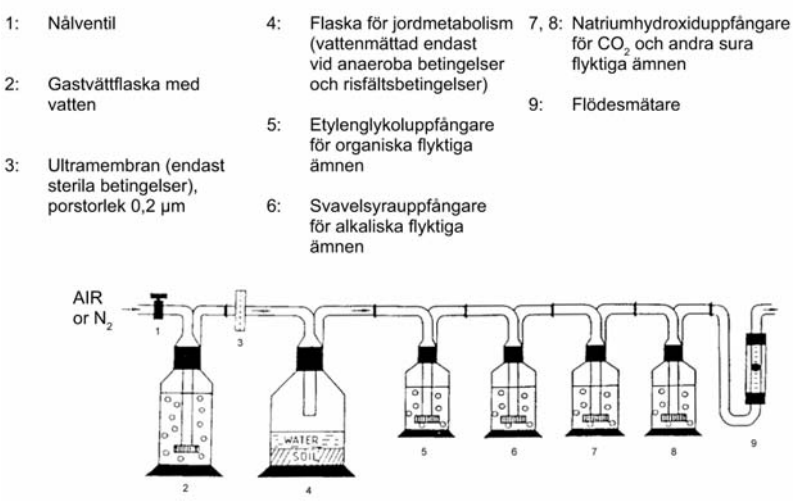
([1]) Vattenkapacitet

▼B

Bilaga 3

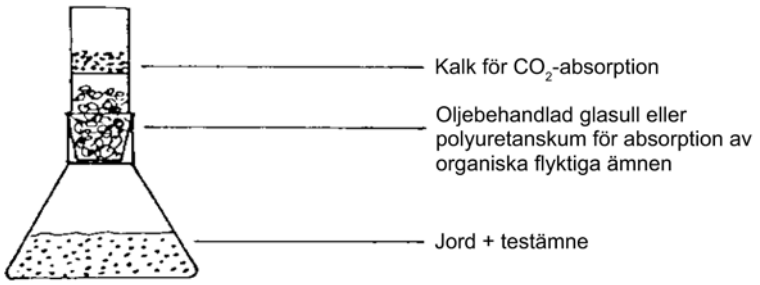
Figur 1

Exempel på genomflödesapparatur för undersökning av kemikaliers omvandling i jord ([1]), ([2])



Figur 2

Exempel på en flaska av biometertyp för undersökning av kemikaliers omvandling i jord ([3])



([1]) J.A. Guth, (1980), ”The study of transformations”, *Interactions between Herbicides and the Soil* (red. R. J. Hance.), *Academic Press,* s. 123–157.

([2]) J .A. Guth, (1981), ”Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil”, *Progress in Pesticide Biochemistry,* (red. D.H. Hutson, T. R. Roberts),./. *Wiley & Sons,* Vol. *1,* s. 85–114.

([3]) J.P.E. Anderson, (1975), ”Einfluss von Temperatur und Feuchte auf Verdampfung, Abbau und Festlegung von Diallat im Boden”, Z. *PflKrankh Pflschutz,* Sonderheft VII, s. 141–146.

▼B

C.24 AEROB OCH ANAEROB OMVANDLING I AKVATISKA SEDIMENTSYSTEM

1. METOD

Denna metod är i stort sett identisk med OECD TG 308 (2002).

1.1 INLEDNING

Kemikalier kan nå grunda eller djupa ytvatten exempelvis via direkt applicering, spridning med vinden, avrinning, dränering, bortskaffande av avfall eller utsläpp från industrin, hushåll, jordbruk och från atmosfären. Den testmetod som beskrivs här är en laboratoriemetod för bedömning av aerob och anaerob omvandling av organiska kemikalier i akvatiska sedimentsystem. Metoden grundar sig på existerande riktlinjer (1), (2), (3), (4), (5), (6). Vid en OECD-workshop om valet av jord och sediment som hölls i Belgirate, Italien, 1995 (7), kom man särskilt överens om hur många och vilka typer av sediment som ska användas i detta test. Workshopen i Belgirate gav också rekommendationer rörande insamling, hantering och lagring av sedimentprover, baserade på ISO-riktlinjer (8). Sådana undersökningar behövs för kemikalier som tillsätts direkt i vatten eller som sannolikt når vattenmiljön på det sätt som beskrivs ovan.

Betingelserna i naturliga akvatiska sedimentsystem är ofta aeroba i den övre vattenfasen. Sedimentets ytskikt kan vara aerobt eller anaerobt, medan djupare liggande sediment i regel är anaeroba. Med tanke på detta beskrivs både aerobt och anaerobt test i detta dokument. I det aeroba testet simuleras en aerob vattenpelare över ett aerobt sedimentskikt under vilket det finns en anaerob gradient. I det anaeroba testet simuleras ett fullständigt anaerobt vatten/sediment-system. I situationer där det krävs betydande avvikelser från dessa rekommendationer, till exempel i fråga om intakta sedimentkärnor eller sediment som kan ha exponerats för testämnet, kan andra metoder användas (9).

1.2 DEFINITIONER

Under alla omständigheter bör SI-enheter användas.

Testämne: Alla ämnen, oavsett det gäller en ursprunglig förorening eller relevanta omvandlingsprodukter.

Omvandlingsprodukter: Alla ämnen som uppstår till följd av biotiska eller abiotiska omvandlingsreaktioner av testämnet, inbegripet CO_2 och bundna rester.

Bundna rester: Sådana föreningar i jorden, i växter eller i djur som blir kvar i matrisen i form av ursprungligt ämne, dess metaboliter eller dess omvandlingsprodukter efter extraktion. Extraktionsmetoden får inte i avsevärd grad leda till förändringar i själva föreningarna eller matrisens struktur. Bindningens karaktär kan delvis klarläggas genom matrisstörande extraktionsmetoder och sofistikerade analysmetoder. Hittills har man på detta sätt kunnat identifiera till exempel kovalenta bindningar, jonbindningar och sorptiva bindningar samt inneslutning. Generellt sett innebär bildningen av bundna rester en betydande minskning av biotillgängligheten (10) (modifierat ur IUPAC 1984 (11)).

▼B

Aerob omvandling (oxidation): Reaktioner som sker i närvaro av molekylärt syre (12).

Anaerob omvandling (reduktion): Reaktioner som sker utan närvaro av molekylärt syre (12).

Naturliga vatten: Ytvatten som fås från dammar, floder, strömmar etc.

Sediment: En blandning av mineraliska och organisk-kemiska beståndsdelar. De senare består av föreningar med hög kol- och kvävehalt samt hög molekylvikt. Sediment deponeras genom inverkan av naturligt vatten och bildar ett gränssnitt med detta vatten.

Mineralisering: Det fullständiga sönderfallet av organiska föreningar till CO_2 och H_2O under aeroba betingelser, och till CH_4, CO_2 och H_2O under anaeroba betingelser. Med mineralisering avses här ett omfattande sönderfall som sker när en radioaktivt märkt förening används och en märkt kolatom oxideras eller reduceras kvantitativt under frigörande av motsvarande mängd $^{14}CO_2$ eller $^{14}CH_4$.

Halveringstid, $t_{0,5}$ – den tid det tar för ett testämne att omvandlas till 50 % när förloppet kan beskrivas med kinetik av första ordningen. Halveringstiden är oberoende av koncentrationen.

DT_{50} (tid för försvinnande 50): Den tid inom vilken testämnets koncentration minskar med 50 %.

DT_{75} (tid för försvinnande 75): Den tid inom vilken testämnets koncentration minskar med 75 %.

DT_{90} (tid för försvinnande 90): Den tid inom vilken testämnets koncentration minskar med 90 %.

1.3 REFERENSÄMNEN

Referensämnen bör användas för identifiering och kvantifiering av omvandlingsprodukterna genom spektroskopiska och kromatografiska metoder.

1.4 UPPLYSNINGAR OM TESTÄMNET

Omärkta eller isotopmärkta testämnen kan användas för bestämning av omvandlingshastigheten. Helst bör dock märkta ämnen användas. Märkt material behövs för undersökning av omvandlingsmönstret och för bestämning av en massbalans. ^{14}C-märkning rekommenderas, även om andra isotoper, såsom ^{13}C, ^{15}N, ^{3}H och ^{32}P kan användas. Märkningen bör om möjligt finnas i molekylens mest stabila del(ar) ([1]). Kemikalien eller den radioaktiva kemikalien bör ha en renhetsgrad som är minst 95 %.

Innan ett test utförs bör följande upplysningar om testämnet finnas tillgängliga:

a) Vattenlöslighet (metod A.6).

b) Löslighet i organiska lösningsmedel.

c) Ångtryck (metod A.4) och Henrys lag-koefficient.

([1]) Om testämnet till exempel innehåller en ring måste märkningen finnas på denna ring. Om testämnet innehåller två eller flera ringar kan det vara nödvändigt med separata försök för utvärdering av vad som händer med de enskilda ringarna och för att få lämpliga upplysningar om bildningen av omvandlingsprodukter.

▼B

d) fördelningskoefficient n-oktanol/vatten (metod A.8).

e) Adsorptionskoefficient (K_d, K_f eller K_{oc}, om lämpligt) (metod C.18).

f) Hydrolys (metod C.7).

g) Dissociationskonstant (pK_a (OECD-riktlinje 112) (13).

h) Testämnets struktur och isotopens (isotopernas) placering, om tillämpligt.

Anmärkning: Den temperatur vid vilken mätningarna görs bör rapporteras.

Övriga användbar information är till exempel upplysningar om testämnets toxicitet för mikroorganismer, upplysningar om lätt eller inneboende bionedbrytbarhet och upplysningar om aerob och anaerob omvandling i jord.

Det bör finnas tillgång till analysmetoder (inbegripet extraktions- och reningsmetoder) för identifiering och kvantifiering av testämnet och dess omvandlingsprodukter i vatten och i sediment (se avsnitt 1.7.2).

1.5 PRINCIP FÖR TESTMETODEN

I den testmetod som beskrivs här används ett aerobt och ett anaerobt akvatiskt sedimentsystem (se bilaga 1). Det ger möjlighet till följande:

i) bestämning av testämnets omvandlingshastighet i ett vatten/sediment-system,

ii) bestämning av testämnets omvandlingshastighet i sedimentet,

iii) bestämning av testämnets och/eller omvandlingsprodukternas mineraliseringshastighet (när ^{14}C-märkta testämnen används),

iv) identifiering och kvantifiering av omvandlingsprodukterna i vatten- och sedimentfaserna samt upprättandet av en massbalans (när radiomärkt testämne används),

v) bestämning av testämnets och omvandlingsprodukternas fördelning mellan de två faserna under en inkubationsperiod i mörker (för att undvika till exempel algblomning) vid konstant temperatur. Halveringstiderna samt värden på DT50, DT75 och DT90 kan bestämmas i de fall där tillräckliga data erhålls, men bör inte extrapoleras till tidpunkter som ligger långt efter försöksperioden (se avsnitt 1.2).

Minst två sedimenttyper och motsvarande vatten behövs för både den aeroba och anaeroba undersökningen (7). Det kan dock förekomma fall där fler än två akvatiska sediment bör används, till exempel om den kemikalie som testas kan förekomma i sötvattenmiljö och marin miljö.

▼B

1.6 TESTETS TILLÄMPBARHET

Metoden kan allmänt tillämpas på alla kemiska ämnen (omärkta eller radioaktivt märkta) för vilka det finns tillgång till en analysmetod som är tillräckligt exakt och känslig. Metoden kan tillämpas på föreningar som är i viss mån flyktiga, icke-flyktiga, lösliga i vatten eller svårlösliga i vatten. Testet bör inte tillämpas på kemikalier som är mycket flyktiga från vatten (till exempel desinfektionsmedel och organiska lösningsmedel) och som därför inte hålls kvar i vatten eller sediment under de försöksbetingelser som gäller för detta test.

Metoden har hittills använts för att undersöka kemikaliers omvandling i sötvatten och sediment, men kan i princip även tillämpas på flodmynning/havsystem. Metoden är inte lämplig för simulering av betingelserna i strömmande vatten (till exempel floder) eller i öppet hav.

1.7 KVALITETSKRITERIER

1.7.1 **Utbyte**

Extraktion och analys som görs av minst dubbla vatten- och sedimentprover omedelbart efter tillförsel av testämnet ger en första indikation på analysmetodens repeterbarhet och enhetligheten hos det förfarande som använts för tillförsel av testämnet. Utbyten för senare stadier av försöken erhålls genom massbalanserna (när märkt material används). Utbytena bör vara 90–110 % för märkta kemikalier (6) och 70–110 % för omärkta kemikalier.

1.7.2 **Analysmetodens repeterbarhet och känslighet**

Analysmetodens repeterbarhet (med undantag av den initiala extraktionseffektiviteten) när det gäller att kvantifiera testämnet och omvandlingsprodukterna, kan kontrolleras genom en duplikatanalys av samma extrakt ur vatten- eller sedimentprover som har inkuberats tillräckligt länge för att omvandlingsprodukter ska ha bildats.

Analysmetodens detektionsgräns (LOD) för testämnet och för omvandlingsprodukterna bör vara minst 0,01 mg· kg^{-1} i vatten eller sediment (som testämne) eller 1 % av den dos som ursprungligen tillfördes testsystemet, beroende på vilket värde som är lägre. Likaså bör kvantifieringsgränsen (LOQ) anges.

1.7.3 **Noggrannheten hos omvandlingsdata**

Genom regressionsanalys av testämnets koncentrationer som en funktion av tiden fås ungefärliga upplysningar om omvandlingskurvans exakthet och en möjlighet att beräkna halveringstidernas konfidensgränser (när kinetik av pseudo-första ordningen tillämpas) eller DT_{50}-värden och, om tillämpligt, DT_{75}- och DT_{90}-värden.

1.8 BESKRIVNING AV METODEN

1.8.1 **Testsystem och utrustning**

Försöken bör utföras i glaskärl (till exempel flaskor eller centrifugrör), utom om förhandsupplysningarna (såsom fördelningskoefficient n-oktanol-vatten eller sorptionsdata) indikerar att testämnet kan bindas till glas, i vilket fall ett alternativt material (till exempel teflon) bör övervägas. Om det är känt att testämnet binds till glas kan problemet eventuellt lindras med en eller flera av följande metoder:

▼B

— bestämning av den massa testämne och omvandlingsprodukter som binds till glas,

— säkerställande av att alla glaskärl tvättas med lösningsmedel i slutet av testet,

— användning av formulerade produkter (se även avsnitt 1.9.2),

— användning av en större mängd hjälplösningsmedel för tillförsel av testämnet till systemet – hjälplösningsmedlet får dock inte leda till så kallad solvolys av testämnet.

Exempel på typisk testutrustning, till exempel genomflödessystem och system av biometertyp, visas i bilagorna 2 och 3 respektive (14). I hänvisning 15 beskrivs andra lämpliga inkubationssystem. Försöksutrustningen bör vara utformad på sådant sätt att luft- eller kväveväxling kan ske och flyktiga produkter kan uppfångas. Utrustningen bör ha sådana mått att testvillkoren uppfylls (se avsnitt 1.9.1). Ventilation kan ordnas genom försiktig bubbling eller genom att låta luft eller kväve passera över vattenytan. I det senare fallet kan det vara rekommendabelt med en försiktig omblandning av vattnet för bättre fördelning av syre eller kväve i vattnet. CO_2-fri luft bör inte användas eftersom detta kan leda till att vattnets pH-värde stiger. Det är under alla omständigheter önskvärt att om möjligt undvika störningar av sedimentet. Kemikalier som är i viss mån flyktiga bör testas i ett system av biometertyp med försiktig omblandning av vattenytan. Man kan även använda stängda kärl där utrymmet ovanför vätskeytan innehåller atmosfärsluft eller kväve och interna kärl för uppfångning av flyktiga produkter (16). Vid aeroba test behövs regelbunden växling av gasen i utrymmet ovanför vätskeytan för att kompensera för biomassans syreförbrukning.

Lämpliga uppfångare för flyktiga omvandlingsprodukter är till exempel kalium- eller natriumhydroxidlösning (1 M) för koldioxid ([1]), och etylenglykol, etanolamin eller tvåprocentig paraffin i xylen för organiska föreningar. Flyktiga ämnen som bildas under anaeroba betingelser, såsom metan, kan uppfångas till exempel med molekylsiktar. Sådana flyktiga ämnen kan förbrännas exempelvis till CO_2 genom att leda gasen genom ett kvartsrör fyllt med CuO vid 900 °C och fånga upp den bildade CO_2-gasen i en absorberare med alkali (17).

Det behövs också laboratorieinstrument för kemisk analys av testämnet och dess omvandlingsprodukter (till exempel gas-vätskekromatografi (GLC), högtrycksvätskekromatografi (HPLC), tunnskiktskromatografi (TLC), masspektrometri (MS), gaskromatografi-masspektrometri (GC-MS), vätskekromatografi-masspektrometri (LC-MS), kärnmagnetisk resonans (NMR)), inbegripet detektionssystem för radioaktivt märkta eller omärkta kemikalier enligt behov. När radioaktivt märkt material används krävs också en vätskeskintillationsräknare och ett oxidationsmedel (för förbränning av sedimentprover före analys med avseende på radioaktivitet).

Likaså behövs övrig normal laboratorieutrustning för fysikalisk-kemiska och biologiska bestämningar (se tabell 1, avsnitt 1.8.2.2), glasvaror, kemikalier och reagenser, efter behov.

([1]) Eftersom dessa alkaliska absorptionslösningar även absorberar ventilationsluftens koldioxid och den koldioxid som bildas genom respiration vid aeroba försök, måste lösningarna regelbundet bytas ut för att de inte ska mättas och förlora sin absorptionskapacitet.

▼B

1.8.2 **Valet av akvatiska sediment, antal sediment**

Provtagningsplatserna bör alltid väljas i enlighet med testets ändamål. Vid valet av provtagningsplats måste hänsyn tas till eventuella utsläpp från jordbruk, industri eller hushåll till tillrinningsområden och till vatten som ligger uppströms. Sediment som inom de senaste fyra åren har förorenats med testämnet eller strukturellt analoga föreningar får inte användas.

1.8.2.1 Valet av sediment

För de aeroba försöken används i regel två sedimenttyper (7). De två sedimenttyper som väljs ut bör ha olika egenskaper med avseende på halten organiskt kol och textur. Ett av sedimenten bör ha en hög halt organiskt kol (2,5–7,5 %) och en fin textur, medan det andra sedimentet bör ha en låg halt organiskt kol (0,5–2,5 %) och en grov textur. Skillnaden mellan halterna organiskt kol bör i regel vara minst 2 %. Ett sediment har en fin textur när halten clay + silt ([1]) överstiger 50 % och en grov textur när halten clay + silt understiger 50 %. Skillnaden mellan de två sedimenttyperna med avseende på halterna clay + silt bör i regel vara minst 20 %. I fall där en kemikalie också kan nå havsvatten måste minst det ena vatten/sediment-systemet vara av marint ursprung.

För strikt anaeroba försök bör två sedimenttyper (med motsvarande vatten) tas från de anaeroba zonerna i ytvattenförekomster (7). Både sediment- och vattenfaserna bör hanteras och transporteras varsamt i syrefria betingelser.

Det kan även finnas andra parametrar som är viktiga vid valet av sediment, och dessa bör beaktas från fall till fall. Exempelvis sedimentens pH-område är en viktig faktor vid testning av kemikalier vars omvandling eller sorption kan vara pH-beroende. Ett sådant beroende kan framgå av testämnets pK_a-värde.

1.8.2.2 Karakterisering av vatten/sediment-prover

I tabellen som följer finns en översikt av de nyckelparametrar som måste bestämmas och rapporteras (med angivelse av den metod som använts) för både vatten och sediment. Likaså anges i vilket skede av testet dessa parametrar bör bestämmas. Metoder för bestämning av dessa parametrar beskrivs i hänvisningarna (18), (19), (20), (21).

Därutöver kan det, beroende på fall, vara nödvändigt att bestämma och rapportera andra parametrar (till exempel för sötvatten: partiklar, alkalinitet, hårdhet, konduktivitet, NO_3/PO_4 (förhållande och individuella värden), för sediment: katjonbyteskapacitet, vattenkapacitet, karbonat, totalkväve och totalfosfor samt för marina system: salinitet). Sediment och vatten behöver kanske också analyseras med avseende på nitrat, sulfat, biotillgängligt järn och eventuellt andra elektronmottagare, i syfte att bedöma redoxbetingelserna, särskilt med tanke på den anaeroba omvandlingen.

([1]) Clay + silt är den mineralfraktion vars partikelstorlek är mindre än 50 μm.

▼B

Bestämning av parametrar för karakterisering av vatten/sediment-prover (7), (22), (23)

Parameter	Skede av testförfarandet					
	Fältprovtagning	Efter-behandl.	Start av acklimatis.	Start av test	Under test	Slut av test
Vatten						
Ursprung/källa	X					
Temperatur	X					
pH	X		X	X	X	X
TOC			X	X		X
Syrehalt$_2$	X		X	X	X	X
Redoxpntential*			X	X	X	X
Sediment						
Ursprung/källa	X					
Skiktets djup	X					
pH		X	X	X	X	X
Partikelstorleksfördelning		X				
TOC		X	X	X		X
Mikrobiell biomassa (*)		X		X		X
Redoxpotential (**)	Observationer (färg/lukt)		X	X	X	X

(*) Färska forskningsresultat tyder på att bestämningar av vattnets syrehalt och redoxpotential inte har något mekanistiskt eller prognostiskt värde när det gäller tillväxt och utveckling hos de mikrobiella populationerna i ytvatten (24), (25). Bestämning av den biokemiska syreförbrukningen (BOD, vid provtagning, start och slut av testet) och koncentrationerna för mikro- och makronäringsämnena Ca, Mg och Mn (vid start och slut av testet) i vatten, och bestämning av totalt N och totalt P i sediment (vid provtagning och vid slut av testet) kan vara bättre metoder när det gäller att tolka och utvärdera hastigheter och rutter för den aeroba bioomvandlingen.

(**) Metod för mikrobiell respiration (26), desinfektionsmetod (27) eller plate count-mätning (till exempel bakterier, aktinomyceter, svamp och kolonier totalt) för aeroba försök; metanogenes för anaeroba försök.

1.8.3 **Insamling, hantering och lagring**

1.8.3.1 *Insamling*

Anvisningarna i utkastet till ISO-riktlinjer om provtagning av bottensediment (8) bör följas vid provtagning av sediment. Sedimentproverna bör tas från sedimentets hela övre skikt (5–10 cm). Tillhörande vatten bör tas från samma plats och vid samma tidpunkt som sedimentprovet tas. För det anaeroba försöket bör sediment- och tillhörande vattenprov tas och transporteras under syrefria betingelser (28) (se avsnitt 1.8.2.1). I litteraturen finns beskrivningar av ett antal olika provtagningsutrustningar (8), (23).

▼B

1.8.3.2 *Hantering*

Sedimentet avskiljs från vatten genom filtrering och våtsiktas (2 mm) med användning av vattenöverskott (vatten från provtagningsplatsen). Detta vatten slängs efter siktningen. Därefter blandas kända mängder sediment och vatten i önskat förhållande (se avsnitt 1.9.1) i inkubationsflaskor och bereds för acklimatiseringsperioden (se avsnitt 1.8.4). Alla hanteringssteg som hör till det anaeroba försöket bör göras under syrefria betingelser (29), (30), (31), (32), (33).

1.8.3.3 *Lagring*

De sediment- och vattenprover som används ska allra helst vara nytagna. Om proverna ändå måste lagras bör sediment och vatten siktas enligt beskrivningen ovan och lagras tillsammans, med vattenmättnad (6–10 cm vattenskikt) i mörker och vid 4 ± 2 °C[4] under högst fyra veckor (7), (8), (23). Proverna för aeroba försök bör lagras med fri tillgång till luft (till exempel i en öppen behållare), medan proverna för anaeroba försök bör lagras i syrefria betingelser. Under transport och lagring får sediment eller vatten inte frysa, och sedimentet får inte torka ut.

1.8.4 **Beredning av sediment/vattenproverna för testet**

Innan testämnet tillförs bör proverna genomgå en acklimatiseringsperiod. För detta placeras varje sediment/vatten-prov i det inkubationskärl som kommer att användas under själva testet, och acklimatiseringen genomförs under exakt samma betingelser som gäller vid inkubationen under testet (se avsnitt 1.9.1). Acklimatiseringsperioden behövs för att systemet ska nå en tillräcklig stabilitet vad gäller pH, syrehalt i vatten, redoxpotential hos sediment och vatten samt makroskopisk separation av faserna. Acklimatiseringsperioden bör i regel omfatta en till två veckor, och bör inte överskrida fyra veckor. Resultaten från de bestämningar som görs under denna period bör rapporteras.

1.9 TESTETS UTFÖRANDE

1.9.1 **Testbetingelser**

Testet bör utföras i inkubationsutrustning (se avsnitt 1.8.1) med ett volymförhållande vatten/sediment mellan 3:1 och 4:1, och ett sedimentskikt med en tjocklek av 2,5 cm (±0,5 cm) ([1]). En minimimängd av 50 g sediment (baserat på torrvikt) per inkubationskärl är rekommenderad.

Testet bör genomföras i mörker vid en konstant temperatur inom intervallet 10–30 °C. Lämplig temperatur är (20 ± 2) °C. Vid behov kan ytterligare en lägre temperatur (till exempel 10 °C) övervägas från fall till fall, beroende på vilka upplysningar man vill få genom testet. Inkubationstemperaturen bör övervakas och rapporteras.

([1]) Färska undersökningar tyder på att lagring vid 4 °C kan leda till en minskning av sedimentets halt av organiskt kol, vilket eventuellt kan leda till en minskning av den mikrobiella aktiviteten (34).

▼B

1.9.2 **Behandling och tillförsel av testämnet**

En enda testkoncentration av kemikalien används ([1]). För växtskyddskemikalier som appliceras direkt i vattendrag används den maximidos som anges på etiketten, beräknad på grundval av vattenytan i testkärlet. I alla andra fall måste den koncentration som används basera sig på prognoser från utsläpp i miljön. Det är viktigt att säkerställa att den koncentration av testämnet som används är lämplig med tanke på karakterisering av omvandlingvägarna samt bildning och minskning av omvandlingsprodukter. Det kan vara nödvändigt att använda högre doser (till exempel 10-faldiga) i situationer där koncentrationerna av testämnet i början av försöket ligger nära detektionsgränserna, eller om viktiga omvandlingsprodukter inte utan svårighet kan detekteras när halterna är 10 % av testämnesdosen. Om högre testkoncentrationer används får de dock inte ha betydande negativa effekter på den mikrobiella aktiviteten i vatten/sediment-systemet. För att få en konstant koncentration av testämnet i kärl av varierande storlek kan det vara lämpligt med en justering enligt den mängd material som har tillförts. Justeringen görs på grundval av vattenpelarens djup i kärlet i förhållande till vattendjupet på provtagningsplatsen (vilket antas vara 100 cm, även om andra djup kan användas). I bilaga 4 finns ett exempel på en beräkning.

Testämnet ska helst tillföras i form av vattenlösning i testsystemets vattenfas. 1 tvingande fall kan användningen av små mängder vattenlösliga lösningsmedel (såsom aceton eller etanol) tillåtas för tillförsel och fördelning av testämnet. Lösningsmedlets halt får dock inte överskrida 1 % (v/v) och det får inte ha negativa verkningar på den mikrobiella aktiviteten i testsystemet. Vattenlösningen av testämnet bör beredas med omsorg – det kan behövas genereringskolumner och förblandare för att säkerställa fullständig homogenitet. Efter tillsats av vattenlösningen till testsystemet rekommenderas varsam omblandning av vattenfasen, med så liten störning av sedimentet som möjligt.

Användningen av formulerade produkter rekommenderas i regel inte, eftersom de ingående beståndsdelarna kan påverka fördelningen av testämnet eller omvandlingsprodukter mellan vatten- och sedimentfaserna. För testämnen som är svårlösliga i vatten kan dock användningen av formulerat material vara ett lämpligt alternativ.

Antalet inkubationskärl beror på antalet provtagningstillfällen (se avsnitt 1.9.3). Testet bör omfatta tillräckligt många system så att två system kan tas ut vid varje provtagningstillfälle. Om testet omfattar kontrollenheter för varje akvatiskt sedimentsystem bör dessa enheter inte behandlas med testämnet. Kontrollenheterna kan användas för att bestämma den mikrobiella biomassan i sedimentet och totalt organiskt kol i vatten och sediment vid testets försökets slut. Två kontrollenheter (en kontrollenhet för varje akvatiskt sediment) kan användas för att övervaka de behövliga parametrarna i sediment och vatten under acklimatiseringsperioden (se tabellen i avsnitt 1.8.2.2). Två extra kontrollenheter måste tas in i fall där testämnet tillförs med hjälp av ett lösningsmedel, för bedömning av de negativa verkningarna på den mikrobiella aktiviteten i testsystemet.

([1]) Test med en extra koncentration kan vara till nytta i fråga om kemikalier som når ytvatten via olika rutter (vilket leder till avsevärt varierande koncentrationer) förutsatt att den lägre koncentrationen kan analyseras med tillräcklig exakthet.

▼B

1.9.3 **Testets varaktighet, provtagning**

Försöksperioden ska i regel inte sträcka sig över 100 dagar (6), och den bör fortsätta tills nedbrytningvägen och fördelningsmönstret för vatten och sediment har fastställts eller när 90 % av testämnet har omvandlats eller förflyktigats. Antalet provtagningstillfällen bör vara minst sex (inbegripet tidpunkt noll), med en valfri förhandsundersökning (se avsnitt 1.9.4) som görs i syfte att fastställa ett lämpligt provtagningsschema och testets varaktighet, i fall där det inte finns tillgång till tillräckliga data om testämnet från tidigare undersökningar. För hydrofoba testämnen kan det under försökets inledningsperiod behövas ytterligare provtagningstillfällen i syfte att bestämma hur fördelningen sker mellan vatten- och sedimentfaserna.

Vid provtagningstidpunkterna avlägsnas inkubationskärlen i sin helhet (med replikat) för analys. Sediment och ovanliggande vatten analyseras separat ([1]). Ytvattnet bör avlägsnas omsorgsfullt med minsta möjliga störning av sedimentet. Extraktionen och karakteriseringen av testämnet och omvandlingsprodukterna bör följa tillbörliga analysförfaranden. Det är viktigt att avlägsna material som kan ha adsorberats till inkubationskärlet eller mellanliggande slangar som används för att fånga upp flyktiga ämnen.

1.9.4 **Valfritt förförsök**

Om testets varaktighet och provtagningsschemat inte kan fastställas med stöd av andra relevanta undersökningar rörande testämnet kan det vara nödvändigt med ett valfritt förförsök. Detta bör utföras under samma betingelser som gäller för det slutliga försöket. I förekommande fall bör testrapporten innehålla en översiktlig redogörelse för relevanta försöksbetingelser och resultat från förförsöket.

1.9.5 **Mätningar och analys**

Vid varje provtagningstillfälle bör testämnets och omvandlingsprodukternas koncentration bestämmas i vatten och sediment, samt rapporteras (som en koncentration och som procentandel av den tillförda koncentrationen). Som allmän regel gäller att identifiering bör göras av alla omvandlingsprodukter som vid något provtagningstillfälle har detekterats med en andel som är ≥ 10 % av den radioaktivitet som tillförts det totala vatten/sediment-systemet, utom om det finns goda skäl för att låta bli. Likaså bör identifiering av omvandlingsprodukter vars koncentrationer kontinuerligt ökar under försökets gång övervägas (även i fall där dessa koncentrationer inte går över de gränser som anges ovan), eftersom ökningen kan tyda på beständighet. Denna fråga bör övervägas från fall till fall, och motiveringarna bör anges i rapporten.

Resultaten från system för uppfångning av gaser och flyktiga ämnen (CO_2 och övriga, till exempel flyktiga organiska ämnen) bör rapporteras för varje provtagningstillfälle. Mineraliseringshastigheterna bör rapporteras. Icke-extraherbara (bundna) rester i sediment bör rapporteras för varje provtagningstillfälle.

([1]) I fall där det förekommer en benägenhet till återoxidation av anaeroba omvandlingsprodukter bör de anaeroba betingelserna upprätthållas under provtagning och analys.

▼B

2 DATA

2.1 BEHANDLING AV RESULTATEN

Den totala massbalansen eller utbytet (se avsnitt 1.7.1) av tillförd radioaktivitet bör beräknas för varje provtagningstillfälle. Resultatet bör rapporteras som en procentandel av den tillförda radioaktiviteten. Fördelningen av radioaktivitet mellan vatten och sediment bör rapporteras som koncentrationer och procentandelar, för varje provtagningstillfälle.

Halveringstiden, DT_{50} och, om tillämpligt, DT_{75} och DT_{90} för testämnet bör beräknas inbegripet konfidensgränser (se avsnitt 1.7.3). Upplysningar om den hastighet med vilken testämnet försvinner i vatten och sediment kan erhållas med hjälp av lämpliga utvärderingsmetoder. Dessa kan omfatta tillämpning av kinetik av pseudoförsta ordningen, empiriska kurvanpassningstekniker där grafiska eller numeriska lösningar används och mer komplexa bedömningar där till exempel modeller med en eller flera behållare används. Närmare upplysningar finns i relevant litteratur (35), (36), (37).

Alla metoder har sina för- och nackdelar samt stora variationer med avseende på komplexitet. Ett antagande om första ordningens kinetik kan innebära en för stark förenkling av nedbrytnings- och fördelningsprocesserna, men ger – i fall där detta antagande kan tillämpas – en term (hastighetskonstanten eller halveringstiden) som är lättbegriplig och av värde vid simuleringsmodellering och beräkningar av förväntade koncentrationer i miljön. Empiriska metoder eller linjära transformationer kan ge bättre anpassning av kurvorna till data, och därmed en bättre uppskattning av halveringstider, DT_{50} och, om tillämpligt, DT_{75} och DT_{90}. Användningen av härledda konstanter är dock begränsad. Med modellen med behållare kan man få ett antal användbara konstanter av värde vid riskbedömning. Dessa beskriver nedbrytningshastigheten i olika behållare och fördelningen av kemikalien. De bör också användas för uppskattning av hastighetskonstanter för bildning och nedbrytning av viktiga omvandlingsprodukter. Under alla omständigheter måste den metod som används motiveras, och anpassningsgraden bör demonstreras grafiskt eller statistiskt.

3 RAPPORTERING

3.1 TESTRAPPORT

Testrapporten ska innehålla nedan angivna uppgifter.

Testämne:

— trivialnamn, kemiskt namn, CAS-nummer, strukturformel (med angivelse av märkningsposition(er) om radioaktivt märkt material används) och relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper,

— testämnets renhet (orenheter),

— strålningskemisk renhet hos märkta kemikalier och molär aktivitet (vid behov).

▼B

Referensämnen:

— kemiskt namn och struktur för referensämnen som används för karakterisering och/eller identifiering av omvandlingsprodukter.

Testsediment och -vatten:

— platsangivelse och beskrivning av provtagningsplats(er) för akvatiska sediment inklusive, om möjligt, föroreningshistoria,

— alla upplysningar rörande insamling, lagring (i förekommande fall) och acklimatisering av vatten/sediment-system,

— egenskaperna hos vatten/sediment-proverna (se tabellen i avsnitt 1.8.2.2).

Testbetingelser:

— testsystem (till exempel genomflöde, biometer, ventilationssätt, omblandningsmetod, vattenvolym, sedimentmassa, tjocklek hos vatten- respektive sedimentskikt, testkärlens mått)

— tillförsel av testämnet till testsystemet: testkoncentration, antalet replikat och kontrollprover, hur testämnet har tillförts (till exempel om lösningsmedel har använts),

— inkubationstemperatur,

— provtagningstidpunkter,

— exktraktionsmetoder och deras effektivitet samt analysmetoder och detektionsgränser,

— metoder för karakterisering och identifiering av omvandlingsprodukter,

— avvikelser från testprotokollet eller testbetingelserna under försökets gång.

Resultat:

— rådata för representativa analyser (alla rådata måste arkiveras enligt principerna om god laboratoriesed),

— analysmetodens repeterbarhet och känslighet,

— utbyten (procentvärden för en valid undersökning anges i avsnitt 1.7.1),

— tabeller med resultaten uttryckta som procentandel av den tillförda dosen och som $mg \cdot kg^{-1}$ i vatten, sediment och totalsystemet (endast procent) för testämnet och, om tillämpligt, för omvandlingsprodukter och icke-extraherbar radioaktivitet,

— massbalans under och i slutet av försöken,

— en grafisk presentation av omvandlingen i vatten, i sediment och i totalsystemet (inbegripet mineralisering),

— mineraliseringshastigheter,

▼B

— halveringstid, DT_{50} och, om tillämpligt, DT_{75} och DT_{90} för testämnet och, om tillämpligt, för viktiga omvandlingsprodukter, inbegripet konfidensgränser i vatten, sediment och totalsystemet,

— en bedömning av omvandlingskinetiken för testämnet och, om tillämpligt, för viktiga omvandlingsprodukter,

— förslag till omvandlingsmönster, om tillämpligt,

— diskussion av resultaten.

4. **HÄNVISNINGAR**

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, s. 35–37.

5. US-EPA: Pesticide assessment guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental fate (1982), 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, Bryssel.

7. OECD Test Guidelines Programme. (1995), Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/sediments, Belgirate, Italy, 18–20 januari 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, s. 945–956 (IUPAC 1984).

12. OECD Test Guideline 304A: 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, s. 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, s. 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, s. 661–667.

18. Black, CA. (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 (17th 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, s. 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”, den 3–4 juli 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 31, s. 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, s. 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, s. 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), s. 13–21.

29. Shelton, D.R. and Tiedje, J.M. (1984), General method for determining anaerobic biodegradation potential. App. Environ. Microbiol. 47, s. 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, s. 1527–1550.

31. Pagga, U. and Beimborn, D.B. (1993), Anaerobic biodegradation tests for organic compounds. Chemoshpere 27, s. 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, s. 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, s. 961–968.

35. Timme, G., Frehse H. and Laska V. (1986), Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues 11. Pflanzenschutz – Nachrichten Bayer, 39, s. 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, s. 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, s. 1349–1354.

▼B

Bilaga 1

VÄGLEDNING RÖRANDE AEROBA OCH ANAEROBA TESTSYSTEM

Aerobt testsystem

Det aeroba testsystem som beskrivs i denna testmetod består av ett aerobt vattenskikt (typisk syrehalt är 7 – 10 mg· l^{-1}) och ett sedimentskikt som är aerobt vid ytan och anaerobt under ytan (den typiska genomsnittliga redoxpotentialen (E_h) i sedimentets anaeroba zon ligger mellan – 80 och – 190 mV). Fuktad luft leds över vattenytan i varje inkubationsenhet för att upprätthålla tillräcklig syrehalt i utrymmet ovanför vätskeytan.

Anaerobt testsystem

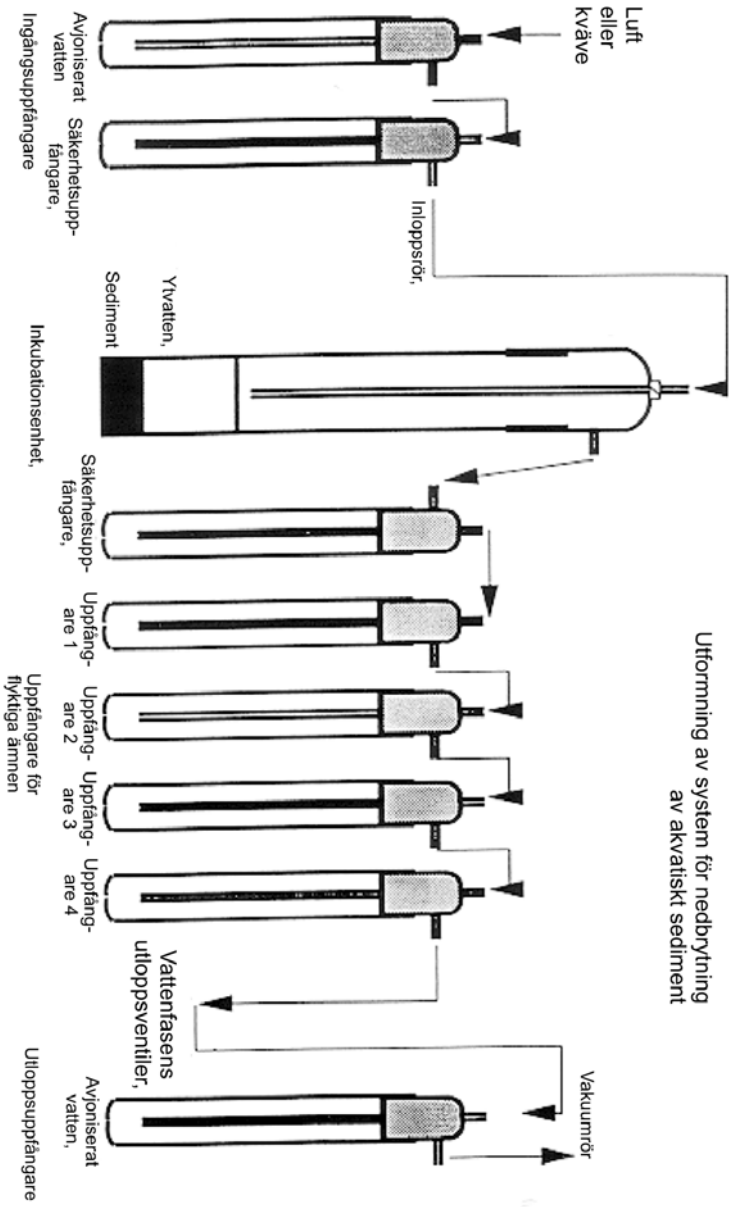
Testförfarandet är till väsentliga delar samma i ett aerobt som i ett anaerobt testsystem, med undantag av att fuktad kvävgas leds över vattenytan i varje inkubationsenhet för att upprätthålla en kvävgasatmosfär. Sediment och vatten anses vara anaeroba när redoxpotentialen (E_h) är lägre än – 100 mV.

I anaeroba test inbegriper bedömningen av mineraliseringen även bedömning av frigjord koldioxid och metan.

▼B

Bilaga 2

EXEMPEL PÅ EN GENOMFLÖDESUTRUSTNING

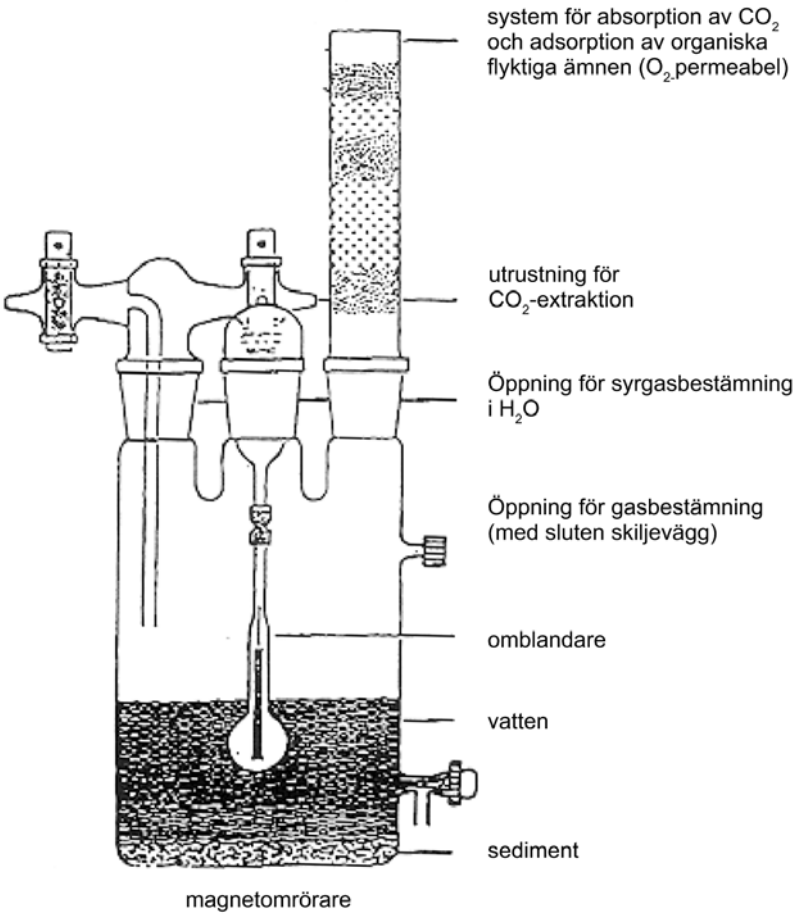


Säkerhetsuppfångare, tom
Uppfångare 1:
Etylenglykol för uppfångning av organiska flyktiga ämnen
Uppfångare 2:
Svavelsyra (0,1 M) för uppfångning av alkaliska flyktiga ämnen
Uppfångare 3 och 4:
Natriumhydroxid (2 M) för uppfångning av CO_2 och andra sura flyktiga ämnen

▼B

Bilaga 3

EXEMPEL PÅ EN HIOMETERUTRUSTNING



▼B

Bilaga 4

EXAMPELBERÄKNINGAR FÖR DEN DOS SOM TILLFÖRS TESTKÄRLEN

Cylinderns innerdiameter:	= 8 cm
Vattenpelarens djup exklusive sediment:	= 12 cm
Yta: $3{,}142 \times 4^2$	= 50,3 cm^2
Dosering: 500 g testämne/ha motsvarar 5 µg/cm^2	
Totalt i µg: $5 \times 50{,}3$	= 251,5 µg
Justering av mängden till att motsvara djupet 100 cm: $12 \times 251{,}5 \div 100$	= 30,18 µg
Vattenpelarens volym: $50{,}3 \times 12$	= 603 ml
Koncentration i vatten: $30{,}18 \div 603$	= 0,050 µg/ml eller 50 µg/l

▼M1

C.25 AEROB MINERALISERING I YTVATTEN – SIMULERINGSTEST AV BIOLOGISK NEDBRYTNING

1. METOD

Denna metod motsvarar OECD TG 309 (2004) (1).

1.1 INLEDNING

Syftet med detta test är att mäta tiden för biologisk nedbrytning av en testsubstans vid låg koncentration i aerobt naturligt vatten, samt att kvantifiera observationerna i form av kinetiska hastighetsuttryck. Detta simuleringstest är ett batchvis skakflasktest för bestämning av hastigheten för aerob nedbrytning av organiska ämnen i prover av naturligt ytvatten (sött, bräckt eller salt). Det är grundat på ISO/DIS 14592–1 (2) och innehåller också delar av testmetoderna C.23 och C.24 (3) (4). För att undvika att mikromiljön i testet försämras vid långa testperioder kan ett semikontinuerligt testförfarande användas i stället för batchtest. Simuleringstestet syftar i första hand till att fastställa testsubstansens mineralisering i ytvatten, och mineralisering utgör grunden för att kunna formulera nedbrytningskinetiken. I andra hand syftar testet emellertid också till att få fram uppgifter om primär nedbrytning och bildandet av viktiga nedbrytningsprodukter. Identifiering av nedbrytningsprodukter, och om möjligt kvantifiering av deras koncentration, är särskilt viktigt för ämnen som mineraliseras mycket långsamt (t.ex. sådana med en halveringstid för den totala mängden kvarvarande ^{14}C på över 60 dygn). Högre koncentrationer av testsubstansen (t.ex. > 100 µg/l) bör med tanke på analytiska begränsningar normalt sett användas för identifiering och kvantifiering av viktiga nedbrytningsprodukter.

I detta test innebär en låg koncentration (t.ex. mindre än 1 µg/l upp till 100 µg/l) att den är tillräckligt låg för att den biologiska nedbrytningskinetiken i testet ska spegla vad som kan förväntas i miljön. Jämfört med den sammanlagda massan av biologiskt nedbrytbara kolsubstrat i det naturliga vatten som används i testet ska den testsubstans som förekommer i låg koncentration fungera som sekundärt substrat. Det innebär att den förväntade biologiska nedbrytningskinetiken är av första ordningen (icke-tillväxt-kinetik) och att testsubstansen kan brytas ned genom s.k. co-metabolism. Första ordningens kinetik innebär att nedbrytningshastigheten (mg/l/dygn) är proportionell till substratkoncentrationen, som minskar med tiden. Vid verklig första ordningens kinetik är den specifika hastighetskonstanten (k) för nedbrytningen oberoende av tid och koncentration. Konstanten k varierar alltså inte märkbart under ett experiments gång, och ändras inte till följd av ökad koncentration mellan experimenten. Enligt definition är den specifika hastighetskonstanten för nedbrytningen lika med den relativa koncentrationsförändringen per tidsenhet: $k = (1/C) \cdot (dC/dt)$. Normalt sett förväntas första ordningens kinetik under de angivna villkoren, men det kan förekomma särskilda förhållanden där annan kinetik är mer passande. Exempelvis kan avvikelser från första ordningens kinetik iakttas om den biologiska omvandlingens hastighet begränsas av massöverföringsfenomen som diffusionshastighet, snarare än av den biologiska reaktionshastigheten. Data kan emellertid nästan alltid beskrivas med hjälp av pseudoförsta ordningens kinetik där man accepterar en hastighetskonstant som är beroende av koncentrationen.

▼M1

Uppgifter om testsubstansens biologiska nedbrytbarhet vid högre koncentrationer (t.ex. från standard-screeningtest) och om abiotisk nedbrytbarhet, nedbrytningsprodukter och relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper bör finnas tillgängliga före testets genomförande för att underlätta planeringen av experimentet och tolkningen av resultaten. Genom att använda ^{14}C-märkta testsubstanser och fastställa fasfördelningen av ^{14}C i slutet av testet blir det möjligt att bestämma fullständig biologisk nedbrytbarhet. Om omärkta testsubstanser används kan fullständig biologisk nedbrytbarhet uppskattas endast om en högre koncentration testas och alla viktiga nedbrytningsprodukter är kända.

1.2 DEFINITIONER

Primär biologisk nedbrytning: Ett kemiskt ämnes strukturella förändring (omvandling) genom mikroorganismer, som leder till att den kemiska identiteten förloras.

Funktionell biologisk nedbrytning: Ett kemiskt ämnes strukturella förändring (omvandling) genom mikroorganismer, som leder till att en viss egenskap förloras.

Fullständig aerob biologisk nedbrytning: Ett kemiskt ämnes nedbrytning genom mikroorganismer i närvaro av syre till koldioxid, vatten och mineralsalter av förekommande grundämnen (mineralisering), och produktion av ny biomassa och organiska mikrobiella biosyntetiska produkter.

Mineralisering: Ett kemiskt ämnes eller organisk materias nedbrytning genom mikroorganismer i närvaro av syre till koldioxid, vatten och mineralsalter av förekommande grundämnen.

Lagfas: Tiden mellan ett tests början och den tidpunkt då de nedbrytande mikroorganismerna har adapterats och graden av biologisk nedbrytning för ett kemiskt ämne eller en organisk materia har nått mätbara nivåer (t.ex. 10 % av den maximala teoretiska biologiska nedbrytningen eller lägre, beroende på mätteknikens noggrannhet).

Maximal biologisk nedbrytningsgrad: Ett kemiskt ämnes eller en organisk materias nedbrytningsgrad i ett test, uttryckt i procent, över vilken ingen ytterligare biologisk nedbrytning sker under testets gång.

Primärt substrat: En samling av naturliga kol- och energikällor som gör att den mikrobiella biomassan kan upprätthållas och tillväxa.

Sekundärt substrat: En substratkomponent som förekommer i så låg koncentration att dess nedbrytning endast förser de berörda mikroorganismerna med obetydliga kol- och energimängder, till skillnad mot det kol och den energi som tillhandahålls vid nedbrytningen av de huvudsakliga substratkomponenterna (primärt substrat).

Hastighetskonstant för nedbrytning: En konstant i första ordningens eller pseudo-första ordningens kinetik, k (d^{-1}), som anger nedbrytningsprocessernas hastighet. För ett batchexperiment uppskattas k från den första delen av den nedbrytningskurva som erhålls efter lagfasens slut.

▼M1

Halveringstid, $t_{1/2}$ (d): Term som används för att beskriva hastigheten för en första ordningens reaktion. Den motsvarar den tid som krävs för en koncentrationsminskning med faktor 2. Förhållandet mellan halveringstiden och hastighetskonstanten för nedbrytningen kan uttryckas med ekvationen $t_{1/2} = \ln 2/k$.

Halveringstid för nedbrytning, DT_{50} (d): Term som används för att kvantifiera resultaten av test av biologisk nedbrytning. Den motsvarar den tid, inbegripet lagfasen, som krävs för att uppnå en biologisk nedbrytning på 50 %.

Detektionsgräns (LOD)och kvantifieringsgräns (LOQ): Detektionsgränsen (LOD) är den koncentration av ett ämne under vilken ämnet inte kan särskiljas från analytiska artefakter. Kvantifieringsgränsen (LOQ) är den koncentration av ett ämne under vilken koncentrationen inte kan bestämmas med tillräcklig noggrannhet.

Löst organiskt kol (DOC): Den del av det organiska kolet i ett vattenprov som inte kan avlägsnas genom specificerad fasseparation, exempelvis genom centrifugering med 40 000 ms^{-2} i 15 minuter eller filtrering genom membran med en porstorlek på 0,2–0,45 μm.

Total ^{14}C-aktivitet i organiskt kol (TOA): Den totala ^{14}C-aktivitet som är kopplad till organiskt kol.

^{14}C-aktivitet i löst organiskt kol (DOA): Den totala ^{14}C-aktivitet som är kopplad till löst organiskt kol.

^{14}C-aktivitet i partikulärt organiskt kol (POA): Den totala ^{14}C-aktivitet som är kopplad till partikulärt organiskt kol.

1.3 TESTMETODENS TILLÄMPLIGHET

Simuleringstestet kan användas för icke-flyktiga eller halvflyktiga organiska ämnen som testas vid låga koncentrationer. Vid användning av öppna flaskor (t.ex. med en propp av bomull) kan ämnen med Henrys konstant under ca 1 $Pa \cdot m^3/mol$ (ung. 10^{-5} $atm \cdot m^3/mol$) i praktiken anses vara icke-flyktiga. Vid användning av förslutna flaskor med en innesluten luftvolym kan halvflyktiga ämnen (med Henrys konstant < 100 $Pa \cdot m^3/mol$ eller < 10^{-3} $atm \cdot m^3/mol$) testas utan förluster från testsystemet. Förlust av ^{14}C-märkta ämnen kan ske när koldioxiden strippas av, om nödvändiga försiktighetsåtgärder inte vidtas. I sådana fall kan det vara nödvändigt att fånga upp koldioxiden i ett internt absorptionsmedel med alkali eller att använda ett externt system för absorption av koldioxid (direkt $^{14}CO_2$-bestämning, se tillägg 3). Om man vill bestämma den biologiska nedbrytningskinetiken måste testsubstansens koncentration vara lägre än dess vattenlöslighet. Det bör emellertid noteras att de värden som anges för vattenlöslighet i litteraturen kan vara avsevärt högre än testsubstansens löslighet i naturliga vatten. Eventuellt kan lösligheten för testsubstanser med särskilt dålig vattenlöslighet fastställas genom användning av de naturliga vatten som ska testas.

Denna metod kan användas för att simulera biologisk nedbrytning i ytvatten utan grova partiklar (pelagiskt test) eller i grumligt ytvatten som exempelvis kan förekomma i gränsskiktet mellan vatten och sediment (suspenderat sediment-test).

▼M1

1.4 TESTPRINCIP

Testet genomförs i batch genom att testsubstansen inkuberas antingen endast med ytvatten (pelagiskt test) eller med vatten med tillsats av suspenderade fasta ämnen/sediment med en torrvikt på 0,01–1 g/l (suspenderat sediment-test) för att simulera ett vattendrag med suspenderade fasta ämnen eller resuspenderat sediment. Koncentrationer av suspenderade fasta ämnen/sediment i den lägre delen av detta intervall är utmärkande för de flesta ytvatten. Testflaskorna inkuberas i mörker vid omgivande temperatur under aeroba förhållanden och omblandning. Minst två olika koncentrationer av testsubstansen bör användas för bestämning av nedbrytningskinetiken. Koncentrationerna bör skilja sig från varandra med en faktor 5 till 10 och bör motsvara den förväntade koncentrationsspridningen i miljön. Testsubstansens högsta koncentration bör inte överstiga 100 µg/l, men maximikoncentrationer under 10 µg/l eller lägre är att föredra för att man ska kunna vara säker på att den biologiska nedbrytningen följer första ordningens kinetik. De lägsta koncentrationerna bör inte överstiga 10 µg/L, men lägsta testkoncentrationer på 1–2 µg/l eller under 1 µg/l är att föredra. Normalt sett kan en adekvat analys av så låga koncentrationer göras med hjälp av ^{14}C-märkta ämnen som finns i handeln. På grund av analytiska begränsningar är det inte alltid möjligt att mäta testsubstansens koncentration med tillräcklig noggrannhet om testsubstansen tillsätts i koncentrationer på ≤ 100 µg/l (se andra stycket i avsnitt 1.7.2). Högre koncentrationer av testsubstansen (> 100 µg/l och ibland > 1 mg/l) kan användas för identifiering och kvantifiering av viktiga nedbrytningsprodukter eller om det inte finns en specifik analysmetod med låg detektionsgräns. Vid test av höga koncentrationer av en testsubstans kan det vara omöjligt att utnyttja resultaten för att uppskatta första ordningens nedbrytningskonstant och halveringstiden, eftersom nedbrytningen förmodligen inte följer första ordningens kinetik.

Nedbrytningen följs vid lämpliga tillfällen genom mätning av kvarvarande ^{14}C eller av testsubstansens restkoncentration vid användning av specifika kemiska analyser. ^{14}C-märkning av molekylens stabilaste del gör att man kan bestämma den totala mineraliseringen, medan ^{14}C-märkning av en mindre stabil del av molekylen eller användning av specifika analyser endast möjliggör bedömning av primär biologisk nedbrytning. Den stabilaste delen av en molekyl innehåller emellertid inte nödvändigtvis molekylens funktionella del (som kan kopplas till en specifik egenskap som toxicitet, bioackumulation o.d.). I sådana fall kan det vara lämpligt att använda en ^{14}C-märkt testsubstans i den funktionella delen, för att följa upp den specifika egenskapens eliminering.

1.5 INFORMATION OM TESTSUBSTANSEN

I detta test kan både radioaktivt märkta och omärkta testsubstanser användas. Det rekommenderas att ^{14}C-märkning används, och märkningen bör normalt sett göras i molekylens stabilaste del (se även avsnitt 1.4). För ämnen som innehåller mer än en aromatisk ring bör helst en eller flera kolatomer i varje ring ^{14}C-märkas. Dessutom bör helst en eller flera kolatomer på båda sidor om bindningar som bryts lätt ^{14}C-märkas. Testsubstansens kemiska och radiokemiska renhet ska vara > 95 %. För radioaktivt märkta ämnen rekommenderas en specifik aktivitet på ca 50 µCi/mg (1,85 MBq) eller mer i syfte att underlätta ^{14}C-mätning i test som genomförs med låg initial koncentration. Följande uppgifter om testsubstansen bör finnas tillgängliga:

▼M1

— Löslighet i vatten [metod A.6].

— Löslighet i organiska lösningsmedel (ämnen som används med lösningsmedel eller har dålig löslighet i vatten).

— Dissociationskonstant (pKa) om ämnet tenderar till protonering eller deprotonering [OECD TG 112] (5).

— Ångtryck [metod A.4] och Henrys konstant.

— Kemisk stabilitet i vatten och i mörker (hydrolys) [metod C.7].

Om ämnen med dålig vattenlöslighet testas i havsvatten kan det också vara bra att känna till utsaltningskonstanten (Setjenovs konstant) K^s, som definieras genom formeln log (S/S') = K^s C_m, där S och S' är ämnets löslighet i söt- respektive saltvatten och C_m är saltets molaritet.

Om testet görs som ett ”suspenderat sediment-test” ska även följande uppgifter finnas tillgängliga:

— Fördelningskoefficient n-oktanol/vatten [metod A.8].

— Adsorptionskoefficient [metod C.18].

Andra viktiga uppgifter, bl.a. följande:

— Koncentration i miljön, såvida den är känd eller kan uppskattas.

— Testsubstansens toxicitet för mikroorganismer [metod C.11].

— Lätt och/eller potentiell biologisk nedbrytbarhet [metoderna C.4 A–F, C.12, C.9, OECD TG 302 (5)].

— Aerob eller anaerob biologisk nedbrytbarhet vid omvandlingsstudier i jord och sediment/vatten [metoderna C.23 och C.24].

1.6 REFERENSSUBSTANS

Ett ämne som normalt sett lätt bryts ned under aeroba förhållanden (t.ex. anilin eller natriumbensoat) bör användas som referenssubstans. Anilin och natriumbensoat kan vanligen förväntas brytas ned på mindre än två veckor. Referenssubstansen ska visa att den mikrobiella aktiviteten i testvattnet ligger inom vissa gränser, dvs. att vattnet innehåller en aktiv population av mikroorganismer.

▼M1

1.7 KVALITETSKRITERIER

1.7.1 **Utbyte**

Omedelbart efter det att testsubstansen tillförts ska alla initiala testkoncentrationer kontrolleras genom mätning av ^{14}C-aktivitet, eller genom kemisk analys om ämnena är omärkta, i minst två prover. Därigenom kan man få information om analysmetodens tillämplighet och repeterbarhet, och om testsubstansen är jämnt fördelad. Normalt sett används den uppmätta initiala ^{14}C-aktiviteten eller testsubstansens koncentration vid de följande analyserna av data, snarare än de nominala koncentrationerna, eftersom man därigenom kompenserar för förluster genom sorption och doseringsfel. För ^{14}C-märkta testsubstanser anges utbytet vid experimentets slut genom massbalans (se sista stycket i avsnitt 1.8.9.4). Idealt sett ska den radioaktivt märkta massbalansen ligga inom intervallet 90 % till 110 %, medan analysnoggrannheten bör ge ett initialt utbyte på mellan 70 % och 110 % för omärkta testsubstanser. Dessa intervall ska ses som mål och bör inte användas som kriterier för huruvida testet ska accepteras. Eventuellt kan analysnoggrannheten för testsubstansen bestämmas vid lägre koncentrationer än den initiala koncentrationen och för viktiga nedbrytningsprodukter.

1.7.2 **Analysmetodens repeterbarhet och känslighet**

Analysmetodens repeterbarhet (inbegripet den initiala extraktionseffektiviteten) när det gäller att kvantifiera testsubstansen och, i förekommande fall, nedbrytningsprodukterna bör kontrolleras genom analys av fem prover av varje enskilt extrakt av ytvattnet.

Analysmetodens detektionsgräns (LOD) för testsubstansen och för nedbrytningsprodukterna bör möjliggöra detektion av 1 % eller mindre av den initiala mängd som tillförts testsystemet. Kvantifieringsgränsen (LOQ) bör vara högst 10 % av den tillförda koncentrationen. För kemisk analys av många organiska ämnen och deras nedbrytningsprodukter krävs ofta att testsubstansen tillförs i relativt hög koncentration, dvs. > 100 μg/l.

1.8 BESKRIVNING AV TESTMETODEN

1.8.1 **Utrustning**

Testet kan utföras i koniska eller cylindriska flaskor av lämplig storlek (t.ex. 0,5 eller 1,0 liter), som försluts med silikon- eller gummiproppar, eller i serumflaskor med koldioxidtäta lock (t.ex. butylgummimembran). En annan möjlighet är att utföra testet med olika flaskor och att ta ut hela flaskor, med minst två replikat, för varje provintervall (se sista stycket i avsnitt 1.8.9.1). För icke-flyktiga testsubstanser som inte är radioaktivt märkta krävs inga gastäta proppar eller lock. Lösa bomullsproppar som hindrar kontaminering från luften är lämpliga (se andra stycket i avsnitt 1.8.9.1). Halvflyktiga ämnen bör testas i system av biometertyp under lätt omrörning av vattenytan. För att undvika bakteriekontamination kan behållarna eventuellt steriliseras genom upphettning eller autoklavering före användning. Dessutom används följande standardutrustning:

— Skakbord eller magnetomrörare för kontinuerlig omblandning av testflaskorna.

▼M1

— Centrifug.

— pH-mätare.

— Turbidimeter för nefelometrisk mätning av grumlighet.

— Ugn eller mikrovågsugn för torrviktsbestämning.

— Utrustning för membranfiltrering.

— Autoklav eller ugn för värmesterilisering av glas.

— Utrustning för hantering av ^{14}C-märkta ämnen.

— Utrustning för att kvantifiera ^{14}C-aktivitet i prover av lösningar från CO_2-fälla och, vid behov, från sedimentprover.

— Analysutrustning för bestämning av testsubstans (och referenssubstans) vid specifik kemisk analys (t.ex. gaskromatograf, högtrycksvätskekromatograf).

1.8.2 **Stamlösningar av testsubstansen**

Avjonat vatten används för att bereda stamlösningar av test- och referenssubstanserna (se första stycket i avsnitt 1.8.7). Det avjonade vattnet ska vara fritt från ämnen som kan vara toxiska för mikroorganismer, och får innehålla högst 1 mg löst organiskt kol (DOC) per liter (6).

1.8.3 **Insamling och transport av ytvatten**

Valet av provtagningsplats för insamling av ytvatten beror på testets syfte i varje given situation. Vid val av provtagningsplatser ska eventuella tidigare utsläpp från jordbruk, industrier och hushåll beaktas. Om det är känt att en akvatisk miljö har blivit kontaminerad med testsubstansen eller en strukturell analog till denna under de senaste fyra åren, bör miljön inte användas för insamling av testvatten, såvida inte undersökningens uttalade syfte är att undersöka nedbrytningstakten på tidigare exponerade platser. Vattnets pH och temperatur bör mätas på provtagningsplatsen. Dessutom bör provtagningsdjupet och vattenprovets utseende (t.ex. färg och grumlighet) noteras (se avsnitt 3). Syrekoncentration och/eller redoxpotential i vatten och i sedimentytan bör mätas för att påvisa att aeroba förhållanden råder, såvida inte platsens utseende och tidigare erfarenheter därifrån gör detta uppenbart. Ytvattnet bör transporteras i en väl rengjord behållare. Provets temperatur under transporten bör inte avsevärt överstiga den temperatur som råder vid testet. Kylning till 4 °C rekommenderas om transporttiden är längre än 2–3 timmar. Vattenprovet får inte frysas.

▼M1

1.8.4 **Lagring och beredning av ytvatten**

Testet bör helst påbörjas inom ett dygn efter provtagningen. Om det är nödvändigt att lagra vattnet bör lagringstiden vara så kort som möjligt. Den får under inga omständigheter överskrida fyra veckor. Vattenprovet bör hållas luftat vid 4 °C fram till användningen. Före användning bör grova partiklar avlägsnas, exempelvis med hjälp av ett nylonfilter med en maskstorlek på ca 100 μm eller ett grovt pappersfilter eller genom sedimentering.

1.8.5 **Beredning av vatten tillsatt med sediment (frivilligt)**

För testet med suspenderat sediment tillsätts ytsediment till flaskorna med naturligt vatten (filtrerat för att avlägsna grova partiklar enligt beskrivning i avsnitt 1.8.4) så att en suspension erhålls. Koncentrationen av suspenderade fasta ämnen bör ligga mellan 0,01 och 1 g/l. Ytsedimentet bör komma från samma plats som vattenprovet. Beroende på den specifika vattenmiljön kan ytsedimentet kännetecknas antingen av en hög halt av organiskt kol (2,5–7,5 %) och fin textur eller en låg halt av organiskt kol (0,5–2,5 %) och grov textur (3). Ytsedimentet kan beredas på följande sätt: Flera sedimentkärnor tas med hjälp av en genomskinlig plastslang. De övre aeroba lagren (från ytan till högst 5 mm djup) skärs av genast efter provtagningen och blandas till ett samlingsprov. Detta sedimentprov bör transporteras i en behållare med en stor innesluten luftvolym för att hålla sedimentet under aeroba förhållanden (kyl till 4 °C om transporten varar mer än 2–3 timmar). Sedimentprovet bör suspenderas i testvattnet i förhållandet 1:10 och hållas luftat vid 4 °C fram till användningen. Om det är nödvändigt att lagra sedimentet bör lagringstiden vara så kort som möjligt. Den får under inga omständigheter överskrida fyra veckor.

1.8.6 **Semikontinuerligt förfarande (frivilligt)**

En förlängd inkubering (flera månader) kan vara nödvändig om det är en lång fördröjningstid innan en betydande nedbrytning av testsubstansen kan mätas. Om detta är känt från tidigare test av ett ämne, kan testet redan från början göras med ett semikontinuerligt förfarande som möjliggör en regelbunden förnyelse av en del av testvattnet eller testsuspensionen (se tillägg 2). Alternativt kan ett normalt batchtest ändras till ett semikontinuerligt test, om ingen nedbrytning av testsubstansen kan påvisas under ca 60 dygns test med batchförfarande (se andra stycket i 1.8.8.3).

1.8.7 **Tillsats av testsubstans eller referenssubstans**

För ämnen med hög vattenlöslighet (> 1 mg/l) och låg flyktighet (Henrys konstant < 1 $Pa \cdot m^3/mol$ eller < 10^{-5} $atm \cdot m^3/mol$) kan en stamlösning beredas i avjonat vatten (se avsnitt 1.8.2). Stamlösning tillsätts i testbehållarna i lämplig volym så att önskad koncentration uppnås. Den volym stamlösning som tillsätts bör vara så liten som det är praktiskt möjligt (helst < 10 % av den slutliga vätskevolymen). Ett annat förfarande är att lösa testsubstansen i en större volym testvatten, vilket kan vara ett alternativ till att använda organiska lösningsmedel.

▼M1

Om det är oundvikligt bör stamlösningar av icke-flyktiga ämnen med låg vattenlöslighet beredas med hjälp av ett flyktigt organiskt lösningsmedel, men den mängd lösningsmedel som sätts till testsystemet bör inte överstiga 1 volymprocent och får inte påverka den mikrobiella aktiviteten negativt. Lösningsmedlet får inte påverka testsubstansens stabilitet i vatten. Lösningsmedlet bör strippas av till en extremt liten kvantitet så att det inte ger en betydande ökning av halten löst organiskt kol i testvattnet eller testsuspensionen. Detta bör kontrolleras genom en ämnesspecifik analys eller om möjligt genom analys av löst organiskt kol (6). Det är viktigt att den tillförda mängden lösningsmedel inte är större än absolut nödvändigt och att mängden testsubstans kan lösas i den slutliga volymen testvatten. Andra metoder att tillsätta testsubstansen i testbehållarna beskrivs i (7) och (8). Om ett organiskt lösningsmedel används för att tillsätta testsubstansen, bör kontroller med lösningsmedel blandat med testvatten (utan tillsatser) och testvatten blandat med referenssubstans behandlas på samma sätt som aktiva testbehållare med testsubstans i lösningsmedel. Syftet med kontrollerna med lösningsmedel är att undersöka lösningsmedlets eventuella negativa effekter på populationen av mikroorganismer, vilka kan påvisas genom testsubstansens nedbrytning.

1.8.8 **Testförhållanden**

1.8.8.1 *Testtemperatur*

Inkubationen bör ske i mörker (att föredra) eller i diffust ljus vid en kontrollerad (± 2 °C) temperatur som kan vara antingen temperaturen i fält eller en standardtemperatur på 20–25 °C. Temperaturen i fält kan vara antingen provets faktiska temperatur vid provtagningstillfället eller en genomsnittlig temperatur i fält på provtagningsplatsen.

1.8.8.2 *Omblandning*

Omblandning genom kontinuerlig skakning eller omrörning måste ske för att hålla partiklar och mikroorganismer i suspension. Omblandningen underlättar också syretransporten från den inneslutna luftvolymen till vätskan så att tillräckligt aeroba förhållanden kan upprätthållas. Flaskorna ställs på ett skakbord (ca 100 rpm) eller också används magnetomrörare. Omblandningen måste vara kontinuerlig. Skakning eller omrörning bör dock ske så försiktigt som möjligt samtidigt som en homogen suspension upprätthålls.

1.8.8.3 *Testets varaktighet*

Testet bör normalt inte pågå i mer än 60 dygn om inte ett semikontinuerligt förfarande med regelbunden förnyelse av testsuspensionen används (se avsnitt 1.8.6 och tillägg 2). Testperioden för batchtest kan dock utsträckas till 90 dygn om testsubstansen har börjat brytas ned under de första 60 dygnen. Nedbrytningen följs med lämpliga tidsintervall genom bestämning av kvarvarande ^{14}C-aktivitet eller utvecklad $^{14}CO_2$ (se avsnitt 1.8.9.4) och/eller genom kemisk analys (avsnitt 1.8.9.5). Inkubationstiden måste vara tillräckligt lång för att det ska vara möjligt att utvärdera nedbrytningsprocessen. Nedbrytningsgraden bör helst vara högre än 50 %. För ämnen som bryts ned långsamt måste nedbrytningsgraden vara tillräckligt hög (normalt över 20 %) för att det ska vara möjligt att uppskatta en kinetisk hastighetskonstant för nedbrytningen.

▼M1

pH och syrekoncentration i testsystemet ska mätas regelbundet om inte tidigare erfarenheter från liknande test med vatten- och sedimentprover tagna på samma plats gör sådana mätningar överflödiga. Under vissa förhållanden kan det hända att metabolism av primära substrat vid mycket högre koncentrationer i vattnet eller sedimentet ger tillräckligt stor koldioxidutveckling och syreförbrukning för att påtagligt ändra försöksbetingelserna under testet.

1.8.9 **Förfarande**

1.8.9.1 *Beredning av flaskor för pelagiskt test*

En lämplig volym testvatten förs över till testflaskorna, upp till en tredjedel av flaskvolymen och inte mindre än ca 100 ml. Även om flera flaskor används (för att kunna ta ut hela flaskor vid varje provtagningstidpunkt) är den lämpliga volymen testvatten ca 100 ml, eftersom en liten provvolym kan påverka lagfasens längd. Testsubstansen tillsätts från en stamlösning enligt beskrivning i avsnitten 1.8.2 och 1.8.7. Minst två olika koncentrationer av testsubstansen åtskilda med en faktor 5–10 bör användas för att bestämma nedbrytningens kinetik och beräkna hastighetskonstanten för nedbrytningen. Båda de valda koncentrationerna bör vara lägre än 100 µg/l och bör helst ligga i intervallet < 1–10 µg/l.

Flaskorna försluts med proppar eller lock som inte släpper genom luft och koldioxid. För icke-flyktiga testsubstanser som inte är ^{14}C-märkta är det lämpligt att använda lösa bomullspluggar som motverkar kontaminering från luften (se avsnitt 1.8.1) under förutsättning att det är känt att alla viktiga nedbrytningsprodukter är icke-flyktiga, och om indirekt bestämning av koldioxid görs (se tillägg 3).

Flaskorna inkuberas vid den valda temperaturen (se avsnitt 1.8.8.1). Prover för kemisk analys eller ^{14}C-mätning tas ut vid testets början (dvs. innan den biologiska nedbrytningen inleds, se avsnitt 1.7.1) och därefter med lämpliga tidsintervall under testets gång. Provtagningen kan göras genom att delprov (t.ex. alikvoter på 5 ml) tas från varje replikat eller genom att hela flaskor tas ut vid varje provtagningstidpunkt. Testsubstansens mineralisering kan bestämmas direkt eller indirekt (se tillägg 3). Vanligen krävs minst fem provtagningar under nedbrytningsfasen (dvs. efter lagfasens slut) för att göra en tillförlitlig bestämning av hastighetskonstanten. För vissa snabbt nedbrytbara ämnen kan det dock vara motiverat att nöja sig med tre provtagningar. För ämnen som inte bryts ned snabbt kan flera mätningar lätt göras under nedbrytningsfasen och därför bör flera datapunkter användas för uppskattning av k. Det kan inte anges något bestämt tidsschema för provtagningen, eftersom den biologiska nedbrytningshastigheten varierar. Provtagning en gång i veckan kan dock rekommenderas om nedbrytningen är långsam. Om testsubstansen är snabbt nedbrytbar, bör provtagning ske en gång per dag under de tre första dygnen och därefter varannan eller var tredje dag. Under vissa omständigheter, exempelvis med ämnen som hydrolyseras mycket snabbt, kan det vara nödvändigt att ta prover en gång i timmen. Det rekommenderas att en preliminär studie görs före testet för att bestämma lämpliga provtagningsintervall. Om prover måste finnas tillgängliga för vidare specifik analys, är det lämpligt att ta flera prover och sedan välja vilka som ska analyseras i slutet av experimentet genom att börja bakifrån, dvs. de sista proverna analyseras först (se andra stycket i avsnitt 1.8.9.5 för vägledning om provernas lagringsbeständighet).

▼M1

1.8.9.2 *Antal flaskor och prover*

Gör i ordning så många flaskor att det räcker till följande:

— Testflaskor: minst två flaskor för varje koncentration av testsubstansen (helst minst tre) eller flera testflaskor för varje koncentration om hela flaskor ska tas ut vid varje provtagningstidpunkt (betecknas F_T).

— Testflaskor för beräkning av massbalans: minst två flaskor för varje testkoncentration (betecknas F_M).

— Blankprov utan testsubstans: minst en flaska med blankprov innehållande endast testvatten (betecknas F_B).

— Referensprov: två flaskor med referenssubstans (t.ex. anilin eller natriumbensoat, 10 μg/l) (betecknas F_C). Syftet med referensprovet är att fastställa lägsta nivån för mikrobiell aktivitet. Om det är lämpligt kan en radioaktivt märkt referenssubstans användas, även om nedbrytningen av testsubstansen följs genom kemiska analyser.

— Sterilt kontrollprov: en eller två flaskor med steriliserat testvatten för att påvisa eventuell abiotisk nedbrytning och annan icke-biologisk förlust av testsubstansen (betecknade F_S). Den biologiska aktiviteten kan avbrytas genom autoklavering (121 °C, 20 min) av testvattnet eller genom tillsats av ett gift (t.ex. natriumazid (NaN_3) 10–20 g/l, kvicksilverklorid ($HgCl_2$) 100 mg/l eller formalin 100 mg/l) eller med hjälp av gammastrålning. Om $HgCl_2$ används bör det behandlas som giftigt avfall. För vatten med stor tillsats av sediment är det inte lätt att åstadkomma sterila förhållanden. I detta fall rekommenderas upprepad autoklavering (t.ex. tre gånger). Tänk på att autoklavering kan leda till att sedimentets sorptionsegenskaper ändras.

— Kontroller med lösningsmedel, innehållande testvatten och testvatten med referenssubstans: två flaskor behandlade med samma mängd lösningsmedel och med samma förfarande som används för att tillsätta testsubstansen. Syftet är att påvisa eventuella negativa effekter av lösningsmedlet genom att bestämma nedbrytningen av referenssubstansen.

Vid testets utformning bör försöksledaren beakta den relativa betydelsen av flera replikat gentemot ett ökat antal provtagningstidpunkter. Det exakta antalet flaskor som behövs beror på vilken metod som används för att mäta nedbrytningen (se tredje stycket i avsnitt 1.8.9.1, avsnitt 1.8.9.4 och tillägg 3).

▼M1

Två delprov (t.ex. alikvoter på 5 ml) bör tas ut från varje flaska vid varje provtagningstidpunkt. Om flera flaskor används för att möjliggöra uttag av hela flaskor, bör minst två flaskor offras vid varje provtagningstidpunkt (se första stycket i avsnitt 1.8.9.1).

1.8.9.3 *Beredning av flaskor för suspenderat sediment-test [frivilligt]*

Lämpliga volymer av testvatten och sediment tillsätts i testkärlen (se avsnitt 1.8.5). Beredningen av flaskor för suspenderat sediment sker på samma sätt som för det pelagiska testet (se avsnitten 1.8.9.1 och 1.8.9.2). Använd helst serumflaskor eller flaskor av liknande form. De förslutna flaskorna placeras horisontellt i en skakapparat. Öppna flaskor för icke-flyktiga ämnen som inte är ^{14}C-märkta bör givetvis placeras upprätt. I detta fall rekommenderas magnetomrörning med glasbelagda magnetstavar. Vid behov luftas flaskorna för att upprätthålla lämpliga aeroba förhållanden.

1.8.9.4 *Radiokemiska bestämningar*

Den utvecklade $^{14}CO_2$ mäts indirekt och direkt (se tillägg 3). $^{14}CO_2$ bestäms indirekt genom skillnaden mellan den initiala ^{14}C-aktiviteten i testvattnet eller suspensionen och den totala kvarvarande aktiviteten vid provtagningstidpunkten mätt efter det att provet surgjorts till pH 2–3 och CO_2 har strippats av. Därigenom avlägsnas organiskt kol och den kvarvarande aktivitet som uppmäts kommer från organiskt material. Indirekt bestämning av $^{14}CO_2$ bör inte ske om viktiga flyktiga nedbrytningsprodukter bildas under testsubstansens omvandling (se tillägg 3). Om möjligt bör $^{14}CO_2$-utvecklingen mätas direkt (se tillägg 3) i minst en flaska vid varje provtagningstidpunkt. Detta förfarande gör det möjligt att kontrollera både massbalans och biologisk nedbrytning, men det kan bara användas vid test som görs med förslutna flaskor.

Om $^{14}CO_2$-utvecklingen mäts direkt under testet, bör flera flaskor göras i ordning för detta syfte vid testets början. Direkt bestämning av $^{14}CO_2$ rekommenderas om viktiga flyktiga nedbrytningsprodukter bildas under testsubstansens omvandling. Vid varje mättillfälle surgörs de extra testflaskorna till pH 2–3 och $^{14}CO_2$ samlas in i ett internt eller externt absorptionsmedel (se tillägg 3).

Eventuellt kan koncentrationerna av ^{14}C-märkt testsubstans och viktiga nedbrytningsprodukter bestämmas med hjälp av radiokromatografi (t.ex. tunnskiktskromatografi, RAD-TLC) eller HPLC med radiokemisk detektion.

Eventuellt kan också fasfördelningen av den kvarvarande radioaktiviteten (se tillägg 1) och rester av testsubstansen och nedbrytningsprodukter bestämmas.

▼M1

Vid testets slut bör massbalansen bestämmas genom direkt $^{14}CO_2$-mätning i separata testflaskor från vilka inga prover har tagits under testets gång (se tillägg 3).

1.8.9.5 *Specifik kemisk analys*

Om det finns en känslig specifik analysmetod kan den primära biologiska nedbrytningen uppskattas genom mätning av den totala restkoncentrationen av testsubstansen i stället för genom radioaktiv märkning. Om en radioaktivt märkt testsubstans används (för att mäta total mineralisering), kan specifika kemiska analyser göras parallellt för att få värdefull kompletterande information och kontrollera förfarandet. Specifika kemiska analyser kan också användas för att mäta nedbrytningsprodukter som bildas under testsubstansens nedbrytning, och detta rekommenderas för ämnen som mineraliseras med halveringstider över 60 dygn. Testsubstansens och nedbrytningsprodukternas koncentration vid varje provtagningstidpunkt bör mätas och rapporteras (som koncentration och som procentandel av den tillförda mängden). Detekterade nedbrytningsprodukter, som vid en viss provtagningstidpunkt har en koncentration $\geq$ 10 % av den tillförda koncentrationen, bör generellt sett identifieras om det inte finns rimlig anledning att avstå. Nedbrytningsprodukter vars koncentrationer kontinuerligt ökar under studien bör helst också identifieras, även om koncentrationerna inte överskrider den ovan nämnda gränsen, eftersom ökningen kan tyda på svårnedbrytbarhet. Analys av nedbrytningsprodukter i sterila kontrollprov bör övervägas om snabb abiotisk omvandling av testsubstansen (t.ex. genom hydrolys) bedöms vara möjlig. Behovet av att kvantifiera och identifiera nedbrytningsprodukter bör bedömas från fall till fall, med motiveringar angivna i rapporten. Metoder som innebär extraktion med organiska lösningsmedel bör användas i enlighet med de riktlinjer som anges för respektive analysförfarande.

Alla prover bör förvaras vid 2–4 °C och lufttätt om analysen utförs inom 24 timmar (att föredra). För längre lagring bör proverna frysas till lägre temperatur än –18 °C eller behandlas med ett kemiskt konserveringsmedel. Surgörning rekommenderas inte som metod att konservera proverna, eftersom surgjorda prover kan vara instabila. Om proverna inte analyseras inom 24 timmar och lagras under längre tid, bör lagringsbeständigheten undersökas för att visa att de intressanta kemikalierna är stabila om de lagras vid lägre temperatur än –18 °C eller i konserverad form. Om analysmetoden innebär extraktion med lösningsmedel eller extraktion med fast fas (SPE), bör extraktionen göras omedelbart efter provtagningen eller efter förvaring av provet i kyla i högst 24 timmar.

Beroende på analysmetodens känslighet, kan det vara nödvändigt med större provvolymer än de som anges i punkt 1.8.1. Testet kan lätt utföras med testvolymer på en liter i flaskor med en volym på 2–3 liter, vilket gör det möjligt att ta ut prover på ca 100 ml.

▼M1

2. **DATA OCH RAPPORTERING**

2.1 BEHANDLING AV RESULTATEN

2.1.1 **Diagram**

Provtagningstiderna avrundas till hela timmar (om inte ämnet bryts ned kraftigt inom minuter eller timmar) men inte till hela dygn. Testsubstansens kvarvarande aktivitet (för ^{14}C-märkta ämnen) eller restkoncentration (för omärkta ämnen) avsätts mot tiden både i ett linjärt och i ett halvlogaritmiskt diagram (se figur 1a och 1b). Om nedbrytning har skett, jämförs resultaten från flaskorna F_T med dem från flaskorna F_S. Om medelvärdena av resultaten från flaskorna med testsubstans (F_T) och de sterila flaskorna (F_S) avviker med mindre än 10 %, kan det antas att den iakttagna nedbrytningen huvudsakligen är abiotisk. Om nedbrytningen i flaskorna F_S är lägre kan siffrorna användas för att korrigera de siffror som erhålls med flaskorna F_T (genom subtraktion) för att uppskatta den biologiska nedbrytningen. Om frivilliga analyser görs av viktiga nedbrytningsprodukter, bör diagram över deras bildning och minskning redovisas utöver diagrammet över testsubstansens minskning.

Uppskatta lagfasens längd t_L utifrån nedbrytningskurvan (halvlogaritmiskt diagram) genom att extrapolera dess linjära del till noll procents nedbrytning eller genom att bestämma tiden för ca 10 % nedbrytning (se figur 1a och 1b). Utifrån det halvlogaritmiska diagrammet bestäms hastighetskonstanten k för första ordningens reaktion, och dess standardfel bestäms genom linjär regression av ln (kvarvarande ^{14}C-aktivitet eller testsubstansens restkoncentration) mot tiden. Särskilt när det gäller ^{14}C-mätningar bör man tänka på att bara använda data som tillhör den första linjära delen av kurvan efter avslutad lagfas, och hellre välja några få representativa data än flera mer osäkra data. En del av osäkerheten beror här på fel förknippade med den rekommenderade direkta användningen av uppmätt kvarvarande ^{14}C-aktivitet (se nedan). Det kan ibland vara lämpligt att beräkna två olika hastighetskonstanter, om nedbrytningen sker i två faser. I så fall definieras två skilda faser på nedbrytningskurvan. Beräkning av hastighetskonstanten k och halveringstiden $t_{½} = \ln 2/k$ bör göras för var och en av de enskilda flaskor som är replikat, om delprov tas ut från samma flaska, eller med hjälp av medelvärden, om hela flaskor tas ut vid varje provtagningstidpunkt (se sista stycket i avsnitt 1.8.9.2). Om det förstnämnda förfarandet följs bör hastighetskonstanten och halveringstiden rapporteras dels för var och en av de enskilda flaskor som är replikat, dels som medelvärde och medelfel. Om höga koncentrationer av testsubstansen har använts, kan nedbrytningskurvan avvika avsevärt från en rät linje (halvlogaritmiskt diagram) och det är möjligt att första ordningens reaktionskinetik inte är giltig. Bestämning av halveringstid har då ingen mening. För ett begränsat dataintervall kan dock pseudo-första ordningens kinetik tillämpas och nedbrytningens halveringstid DT_{50} (tiden för att nå 50 % nedbrytning) uppskattas. Man måste dock komma ihåg att nedbrytningens förlopp utanför det valda dataintervallet inte kan förutsägas med hjälp av DT_{50} som endast är en deskriptor för en given uppsättning data. Det finns gott om analytiska verktyg som underlättar statistiska beräkningar och anpassning av kurvor, och användning av sådana program rekommenderas.

▼M1

Om specifika kemiska analyser görs, uppskattas hastighetskonstanter och halveringstider för primär nedbrytning på det sätt som ovan beskrivits för total mineralisering. Om den primära nedbrytningen är den begränsande processen, kan i vissa fall datapunkter från hela nedbrytningsförloppet användas. Detta för att mätningarna är direkta till skillnad från mätningar av ^{14}C-aktivitet.

Om ^{14}C-märkta ämnen används, bör massbalans uttryckas i procent av den tillförda initiala koncentrationen, åtminstone vid testets slut.

2.1.2 **Kvarvarande aktivitet**

När en ^{14}C-märkt del av ett organiskt ämne bryts ned biologiskt, omvandlas större delen av ^{14}C till $^{14}CO_2$, medan en annan del används för uppbyggnad av biomassa och/eller syntes av extracellulära metaboliter. En fullständig biologisk nedbrytning av ett ämne innebär därför inte en hundraprocentig omvandling av dess kol till $^{14}CO_2$. Det ^{14}C som byggs in i produkter som bildas genom biosyntes frigörs sedan långsamt som $^{14}CO_2$ genom s.k. sekundär mineralisering. Diagram över kvarvarande ^{14}C-aktivitet (mätt efter det att CO_2 har strippats av) eller över $^{14}CO_2$-utvecklingen avsatt mot tiden, kommer därför att uppvisa en ”svans” efter avslutad nedbrytning. Detta försvårar en kinetisk tolkning av data, och av denna anledning bör i normala fall endast den första delen av kurvan (efter avslutad lagfas och innan ca 50 % nedbrytning har uppnåtts) användas för att uppskatta hastighetskonstanten för nedbrytningen. Om testsubstansen bryts ned är den totala kvarvarande ^{14}C-aktiviteten alltid högre än den ^{14}C-aktivitet som beror på återstående onedbruten testsubstans. Om testsubstansen bryts ned genom en första ordningens reaktion och en konstant andel α mineraliseras till CO_2, kommer den initiala lutningen på den kurva som visar hur ^{14}C avtar (totalt organiskt ^{14}C avsatt mot tiden) att vara α gånger lutningen för testsubstansens koncentration (eller för att vara noggrann, den del av testsubstansen som är märkt med ^{14}C). Om okorrigerade mätvärden av den totala ^{14}C-aktiviteten används, kommer därför den beräknade hastighetskonstanten för nedbrytningen att vara för låg. Metoder för att uppskatta testsubstansens koncentration utifrån uppmätt radiokemisk aktivitet på grundval av olika förenklande antaganden har beskrivits i litteraturen (2) (9) (10) (11). Dessa metoder är lättast att använda för snabbt nedbrytbara ämnen.

2.2 TOLKNING AV RESULTAT

Om hastighetskonstanten k konstateras vara oberoende av den tillförda koncentrationen (dvs. om k har ungefär samma värde vid olika koncentrationer av testsubstansen) kan det antas att första ordningens hastighetskonstant är representativ för rådande testförhållanden, dvs. testsubstans, vattenprov och testtemperatur. I vilken utsträckning resultaten kan generaliseras eller extrapoleras till andra system måste utvärderas genom en expertbedömning. Om en hög koncentration av testsubstansen används och nedbrytningen därför inte följer första ordningens kinetik, kan data inte användas för direkt uppskattning av första ordningens hastighetskonstant eller motsvarande halveringstid. Data som erhålls från ett test med en hög koncentration av testsubstansen kan dock ändå vara användbara för att uppskatta den totala mineraliseringsgraden och för att påvisa och kvantifiera nedbrytningsprodukter.

▼M1

Om hastigheterna för andra förlustprocesser än biologisk nedbrytning är kända (t.ex. hydrolys eller avdunstning) kan dessa dras av från den nettoförlusthastighet som observerats under testet för att ge en ungefärlig uppskattning av den biologiska nedbrytningshastigheten. Data över hydrolys kan exempelvis erhållas från det sterila kontrollprovet eller från parallelltest med en högre koncentration av testsubstansen.

Indirekt och direkt bestämning av $^{14}CO_2$ (avsnitt 1.8.9.4 och tillägg 3) kan bara användas för att mäta storleken av testsubstansens mineralisering till CO_2. Radiokromatografi (RAD-TLC) eller HPLC kan användas för att analysera koncentrationerna av ^{14}C-märkt testsubstans och bildning av viktiga nedbrytningsprodukter (tredje stycket i avsnitt 1.8.9.4). För att kunna göra en direkt uppskattning av halveringstiden är det nödvändigt att inga viktiga nedbrytningsprodukter (definierat som ≥ 10 % av den tillförda mängden testsubstans) är närvarande. Om sådana viktiga nedbrytningsprodukter är närvarande, krävs en noggrann utvärdering av data. Detta kan innebära upprepade test och/eller identifiering av nedbrytningsprodukter (se första stycket i avsnitt 1.8.9.5) om inte nedbrytningsprodukternas öde kan bedömas på ett rimligt sätt erfarenhetsmässigt (t.ex. med hjälp av information om reaktionsvägen för nedbrytningen). Eftersom den proportion av testsubstansens kol som omvandlas till CO_2 varierar (till stor del beroende på koncentrationen av testsubstans och andra närvarande substrat, testförhållandena och mikroorganismsamhället), möjliggör detta test inte en direkt uppskattning av fullständig biologisk nedbrytning som i ett test av eliminering av löst organiskt kol, men resultatet liknar det som erhålls med ett respirometertest. Mineraliseringsgraden kommer alltså att vara lägre än eller lika med den lägsta nivån av slutlig biologisk nedbrytning. För att få en mer fullständig bild av den slutliga biologiska nedbrytningen (mineralisering och inkorporering i biomassa), bör analysen av fasfördelningen av ^{14}C utföras i slutet av testet (se tillägg 1). Det ^{14}C som ingår i partikelfasen utgörs av ^{14}C inkorporerat i bakteriebiomassa och ^{14}C sorberat till organiska partiklar.

2.3 TESTETS VALIDITET

Om referenssubstansen inte bryts ned inom det förväntade tidsintervallet (för anilin och natriumbensoat vanligen mindre än två veckor), kan testets validitet betvivlas och måste verifieras ytterligare, eller också görs testet om med ett nytt vattenprov. I en ISO-interkalibrering av metoden, där sju laboratorier från olika delar av Europa deltog, låg de anpassade hastighetskonstanterna för nedbrytning av anilin i intervallet 0,3–1,7 $dygn^{-1}$ med ett medelvärde på 0,8 $dygn^{-1}$ vid 20 °C och ett standardfel på 0,4 $dygn^{-1}$ ($t_{½}$ = 0,9 dygn). Lagfasen varade normalt mellan 1 och 7 dygn. De undersökta vattnen rapporterades ha en bakteriebiomassa motsvarande 10^3–10^4 kolonibildande enheter (CFU) per ml. Nedbrytningshastigheterna i näringsrika mellaneuropeiska vatten var högre än i nordiska näringsfattiga vatten, vilket kan bero på olikheten i näringsstatus eller tidigare exponering för kemiska ämnen.

Det totala utbytet (massbalans) vid experimentets slut bör ligga mellan 90 % och 110 % för radioaktivt märkta ämnen, medan det initiala utbytet av experimentets början bör ligga mellan 70 % och 110 % för omärkta ämnen. Dessa intervall bör dock endast ses som mål och bör inte användas som kriterier för huruvida testet ska accepteras.

▼M1

3. **TESTRAPPORT**

Typen av undersökning, dvs. pelagiskt test eller suspenderat sediment-test, ska klart anges i testrapporten, som också ska innehålla åtminstone följande uppgifter:

Testsubstans och referenssubstans(er):

— Trivialnamn, kemiska namn (IUPAC-namn och/eller CAS-namn rekommenderas), CAS-nummer, strukturformler (med angivelse av positionen för ^{14}C om radioaktivt märkta ämnen används) samt relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper hos testsubstans och referenssubstans (se avsnitten 1.5 och 1.6).

— Kemiska namn, CAS-nummer, strukturformler (med angivelse av positionen för ^{14}C om radioaktivt märkta ämnen används) samt relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper hos ämnen som används som standard för identifiering och kvantifiering av nedbrytningsprodukter.

— Test- och referenssubstansers renhet och eventuella föroreningar.

— Radiokemisk renhet hos den märkta kemikalien och dess specifika aktivitet (i tillämpliga fall).

Ytvatten:

För de vattenprover som tas ska minst följande uppgifter anges:

— Läge och beskrivning av provtagningsstället, om möjligt även dess föroreningshistoria.

— Datum och tid för provtagning.

— Näringsämnen (total-N, ammonium, nitrit, nitrat, total-P, löst ortofosfat).

— Provtagningsdjup.

— Provets utseende (t.ex. färg och grumlighet).

— DOC och TOC.

— BOD.

— Temperatur och pH på provtagningsplatsen vid provtagningstillfället.

— Syrehalt eller redoxpotential (obligatoriskt endast om det inte är uppenbart att aeroba förhållanden råder).

— Salthalt eller konduktivitet (om det är fråga om saltvatten eller bräckt vatten).

— Suspenderade fasta ämnen (om provet är grumligt).

— Eventuellt annan relevant information om provtagningsplatsen vid provtagningstillfället (t.ex. aktuella eller historiska uppgifter om flödeshastighet i vattendrag eller havsströmmar, större utsläpp i närheten och utsläppstyp, väderförhållanden före provtagningstillfället).

Frivilligt anges följande:

— Mikrobiell biomassa (t.ex. direkt räkning med akridinorange eller kolonibildande enheter).

▼**M1**

— Oorganiskt kol.

— Klorofyll-a-koncentration som ett specifikt mått på algbiomassa.

Dessutom bör följande uppgifter om sediment lämnas om test med suspenderat sediment görs:

— På vilket djup sedimentprovet tagits.

— Sedimentets utseende (t.ex. färgat, lerigt, dyigt eller sandigt).

— Textur (t.ex. % grovsand, finsand, mjäla och lera).

— Torrvikt av suspenderade fasta ämnen i g/l, TOC-koncentration eller glödförlust som ett mått på innehåll av organiskt material.

— pH.

— Syrehalt eller redoxpotential (obligatoriskt endast om det inte är uppenbart att aeroba förhållanden råder.

Testförhållanden:

— Tid mellan provtagning och användning i laboratorietest, lagring och förbehandling av provet, datum då undersökningen gjordes.

— Tillförd mängd testsubstans, testkoncentration och referenssubstans.

— Metod för tillförsel av testsubstans med uppgift om eventuella lösningsmedel.

— Använd volym ytvatten och sediment (i tillämpliga fall) samt provvolym som tagits ut för analys vid varje provtagningstidpunkt.

— Beskrivning av det använda testsystemet.

Om inkubationen inte sker i mörker, information om ”diffusa ljusförhållanden”:

— Information om metod(er) som används för att bereda sterila kontrollprover (t.ex. temperatur, tid och antal autoklaveringar).

— Inkubationstemperatur.

— Information om analysmetoder och metoder som används för radiokemiska mätningar, massbalanskontroll och mätningar av fasfördelning (om detta genomförs).

— Antal replikat.

Resultat:

— Procentuellt utbyte (se avsnitt 1.7.1).

— Repeterbarhet och känslighet hos de analysmetoder som används samt detektionsgräns och kvantifieringsgräns (se avsnitt 1.7.2).

▼M1

— Alla mätdata (även provtagningstidpunkter) och beräknade värden i tabellform och nedbrytningskurvor. För varje testkoncentration och för varje flaska som är replikat rapporteras den linjära korrelationskoefficienten för den logaritmiska kurvans lutning, uppskattad lagfas och första eller pseudo-första ordningens hastighetskonstant (om möjligt) samt motsvarande halveringstid för nedbrytningen (eller halveringstiden t_{50}).

— Relevanta värden rapporteras som medelvärden av de resultat som observeras i enskilda replikat, t.ex. lagfasens längd, hastighetskonstanten och halveringstiden för nedbrytningen (eller t_{50}).

— Systemet kategoriseras som antingen ej adapterat eller adapterat med utgångspunkt från nedbrytningskurvans utseende och eventuell påverkan från testkoncentrationen.

— Resultaten av den slutliga kontrollen av massbalans och av mätningar av fasfördelning (i tillämpliga fall).

— Andelen mineraliserat ^{14}C och, om specifika analyser görs, slutlig grad av primär nedbrytning.

— Identifiering, molaritet och procentandel av tillförda och viktiga nedbrytningsprodukter (se första stycket i avsnitt 1.8.9.5), i tillämpliga fall.

— Föreslagen reaktionsväg för omvandlingen, i tillämpliga fall.

— Diskussion av resultaten.

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. Testing Method C.23. Aerobic and anaerobic transformation in soil.

4. Testing Method C.24. Aerobic and anaerobic transformation in aquatic sediments.

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

Tillägg 1

Fasfördelning av ^{14}C

För att kontrollera förfarandet bör de rutinmässiga mätningarna av kvarvarande total ^{14}C-aktivitet i organiskt kol (TOA) kompletteras med mätningar av massbalans, inklusive en direkt bestämning av utvecklad $^{14}CO_2$ efter uppfångning i ett absorptionsmedel (se tillägg 3). En positiv bildning av $^{14}CO_2$ är i sig själv ett direkt bevis på biologisk nedbrytning, i motsats till abiotisk nedbrytning och andra förlustmekanismer, exempelvis avdunstning och sorption. Ytterligare värdefull information om den biologiska nedbrytningsprocessen kan erhållas genom mätningar av den totala ^{14}C-aktivitetens fördelning mellan löst tillstånd (^{14}C-aktivitet i löst organiskt kol, DOA) och partikeltillstånd (^{14}C-aktivitet i partikulärt organiskt kol, POA) efter separation av partiklar genom membranfiltrering eller centrifugering. POA utgörs av testsubstans sorberad på den mikrobiella biomassan och på andra partiklar utöver det kol i testsubstansen som har använts för syntes av nytt cellulärt material och därigenom inkorporerats i den partikulära biomassafraktionen. Bildningen av löst organiskt ^{14}C-material kan uppskattas som DOA vid slutet av den biologiska nedbrytningen (platå på kurvan med nedbrytning avsatt mot tiden).

Fasfördelningen av kvarvarande ^{14}C i utvalda prover uppskattas genom filtrering av prov på ett membranfilter med porstorleken 0,22 μm eller 0,45 μm av ett material som inte adsorberar betydande mängder av testsubstansen (polykarbonatfilter kan vara lämpliga). Om testsubstansens sorption på filtret inte är försumbar (kontrolleras före experimentet), kan höghastighetscentrifugering (2 000 g i 10 minuter) användas i stället för filtrering.

Filtratet eller centrifugatet behandlas på det sätt som beskrivs i tillägg 3 för ofiltrerade prover. Lös upp membranfiltret i en lämplig scintillationsvätska och räkna på vanligt sätt. Normalt används metoden med extern standardkvot för att korrigera för quenching, eller också behandlas provet med ett oxidationsmedel. Om centrifugering har använts, resuspenderas den pellet som bildats av partikelfraktionen i 1–2 ml destillerat vatten och överförs till en scintillationsflaska. Därefter sköljs två gånger med 1 ml destillerat vatten och sköljvattnet överförs till flaskan. Vid behov kan suspensionen läggas i en gel för vätske-scintillationsräkning.

▼M1

Tillägg 2

Semikontinuerligt förfarande

En förlängd inkubering upp till flera månader kan krävas för att få en tillräcklig nedbrytning av svårnedbrytbara ämnen. Testet bör normalt inte pågå i mer än 60 dygn om inte det ursprungliga vattenprovets egenskaper bibehålls genom förnyelse av testsuspensionen. Testperioden kan dock utsträckas till högst 90 dygn utan förnyelse av testsuspensionen om testsubstansen har börjat brytas ned under de första 60 dygnen.

Om inkubationen varar lång tid kan mikroorganismsamhällets diversitet minska på grund av olika förlustmekanismer och på grund av att viktiga näringsämnen och primära kolsubstrat i vattenprovet förbrukas. Därför rekommenderas att ett semikontinuerligt test används för att på ett tillfredsställande sätt bestämma nedbrytningshastigheten för ämnen som bryts ned långsamt. Testet bör redan från början göras med ett semikontinuerligt förfarande om, på grundval av tidigare erfarenhet, en inkubationstid på tre månader bedöms vara nödvändig för att uppnå 20 % nedbrytning av ämnet. Alternativt kan ett normalt batchtest ändras till ett semikontinuerligt test, om ingen nedbrytning av testsubstansen kan påvisas under ca 60 dygns test med batchförfarande. Det semikontinuerliga förfarandet kan avbrytas och testet fortsättas som ett batchexperiment när en betydande nedbrytning har registrerats (t.ex. > 20 %).

I det semikontinuerliga testet ersätts varannan vecka ca en tredjedel av testsuspensionen med nytaget vatten med tillsats av testsubstans till initial koncentration. Även sediment tillsätts det nya vattnet till initial koncentration (mellan 0,01 och 1 g/l) om det frivilliga suspenderat sediment-testet görs. Vid utförande av test med suspenderat fast sediment är det viktigt att ett helt suspenderat system upprätthålls även vid förnyelse av vatten, och att uppehållstiden är identisk för fasta ämnen och vatten. I annat fall kan den avsedda likheten med ett homogent vattensystem utan bestämda faser utebli. Av dessa skäl rekommenderas att den initiala koncentrationen av suspenderat sediment ligger i den lägre delen av det angivna intervallet när det semikontinuerliga förfarandet används.

Den föreskrivna tillsatsen av testsubstans innebär att den initiala koncentrationen inte överskrids genom den partiella förnyelsen av testsuspensionen och därigenom undviks den adaptation som ofta ses vid höga koncentrationer av testsubstansen. Eftersom förfarandet innebär både en förnyad ympning och en kompensation av förbrukade näringsämnen och primära substrat, återställs den ursprungliga mikrobiella diversiteten, och testet kan i princip pågå i oändlighet. När det semikontinuerliga förfarandet används är det viktigt att notera att den kvarvarande koncentrationen av testsubstansen måste korrigeras för de mängder testsubstans som tillförs och avlägsnas vid varje förnyelse. För lågsorberande ämnen kan testsubstansens totala koncentration antas vara lika med den lösta koncentrationen. Sorptionen är obetydlig (< 5 %) under angivna förhållanden (0,1–1 g fasta ämnen/l) för ämnen för vilka log K_{ow} < 3 (gäller för neutrala, lipofila föreningar). Detta illustreras av följande beräkningsexempel: 0,1 g/l av fasta ämnen motsvarar ungefär 10 mg kol per liter (andelen kol f_C = 0,01). Antag att

Log K_{ow} (för testsubstansen) = 3

$K_{oc} = 0{,}42 \times K_{ow}$

Fördelningskoefficienten $K_d = f_C \times K_{oc}$

Då är den lösta delen av den totala koncentrationen (C-vatten (C_w)/C-total (C_t):

$C_w/C_t = 1/(1 + K_d \times SS) = 1(1 + K_{oc} \times f_C \times SS) = 1/(1 + 0{,}42 \times 10^3 \times 0{,}01 \times 0{,}1 \times 10^{-3}) = 0{,}999$

▼M1

Tillägg 3

Bestämning av $^{14}CO_2$

Indirekt $^{14}CO_2$-bestämning

För rutinmässiga mätningar är i normala fall den indirekta metoden den minst tidskrävande och noggrannaste metoden om testsubstansen är icke-flyktig och inte omvandlas till flyktiga nedbrytningsprodukter. Ofiltrerade prover på t.ex. 5 ml förs över till scintillationsflaskor. Lämplig aktivitet i proverna är 5 000 dpm–10 000 dpm (80–170 Bq) initialt, med en lägsta initial aktivitet på ca 1 000 dpm. CO_2 strippas av efter surgörning till pH 2–3 med 1–2 droppar koncentrerad H_3PO_4 eller HCl. CO_2 kan strippas av genom bubbling med luft i ca ½–1 timme. Alternativt kan flaskorna skakas kraftigt i 1–2 timmar (t.ex. på ett skakbord för mikrotiterplattor) eller mer försiktigt över natten. Effektiviteten vid strippning av CO_2 måste kontrolleras (genom att tiden för luftning eller skakning förlängs). Därefter tillsätts en scintillationsvätska som är lämplig för att räkna vattenprov, provet homogeniseras med en virvelblandare och radioaktiviteten bestäms genom vätske-scintillationsräkning, med avdrag för den bakgrundsaktivitet som uppmäts i blankproverna (F_B). Om testvattnet inte är kraftigt färgat och inte har en hög partikelkoncentration, uppvisar proverna normalt sett en enhetlig quenching, och det räcker då att korrigera för quenching med hjälp av en extern standard. Om testvattnet är kraftigt färgat kan det vara nödvändigt att korrigera för quenching genom tillsats av en intern standard. Om partikelkoncentrationen är hög kan det vara omöjligt att åstadkomma en homogen lösning eller gel, eller också kan det vara stor variation i quenching mellan olika prover. I så fall kan den nedan beskrivna räknemetoden för testslam användas. Om testet utförs som ett suspenderat sediment-test, kan $^{14}CO_2$ mätning göras indirekt genom att ett homogent 10 ml prov av testvatten/suspension tas ut och faserna separeras genom centrifugering vid lämplig hastighet (t.ex. 40 000 m/s^2 i 15 minuter). Vattenfasen behandlas sedan enligt beskrivningen nedan. ^{14}C-aktiviteten i partikelfasen (POA) bestäms genom att sedimentet resuspenderas i en liten volym destillerat vatten, överförs till scintillationsflaskor och tillsätts scintillationsvätska så att en gel bildas (det finns särskilda scintillationsvätskor för det ändamålet). Beroende på partiklarnas karaktär (t.ex. deras innehåll av organiskt material) kan det vara lämpligt att låta provet sönderdelas över natten med ett vävnadsupplösande ämne och sedan homogeniseras med en virvelblandare före tillsats av scintillationsvätska. Alternativt kan POA bestämmas genom förbränning i syreöverskott med hjälp av en provoxiderare. Vid räkning bör interna standarder alltid ingå, och det kan vara nödvändigt att korrigera för quenching genom tillsats av en intern standard i varje enskilt prov.

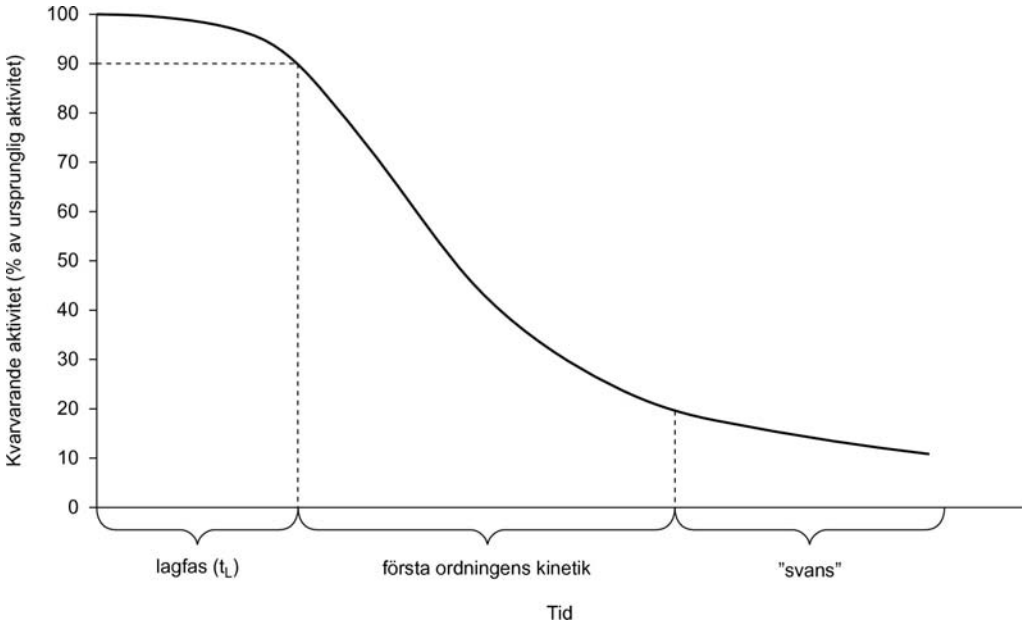
Direkt $^{14}CO_2$-bestämning

Om den utvecklade $^{14}CO_2$ mäts direkt bör detta göras genom att flera flaskor görs i ordning vid testets början, och testflaskorna provtas vid varje mättidpunkt genom att surgöras till pH 2–3 och $^{14}CO_2$ tas upp i ett internt (placerat i varje flaska vid testets början) eller externt absorptionsmedel. Som absorptionsmedel kan användas antingen alkali (t.ex. 1 N NaOH-lösning eller en NaOH-pellet), etanolamin eller ett etanolaminbaserat absorptionsmedel eller kommersiellt tillgängliga absorptionsmedel. För direkt mätning av $^{14}CO_2$, bör flaskorna vara förslutna med exempelvis butylgummimembran.

▼M1

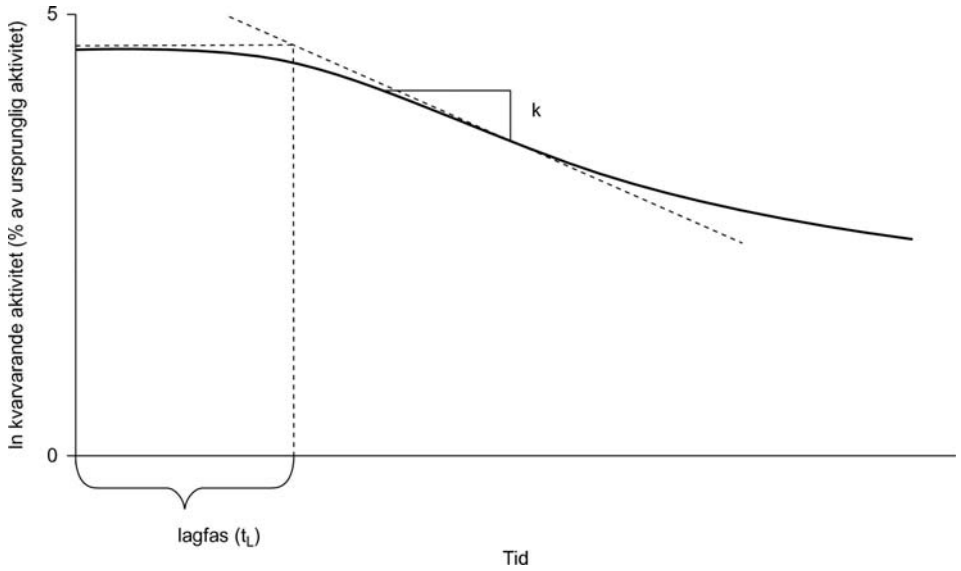
Figur 1a

Exempel på ett aritmetiskt diagram över data (kvarvarande aktivitet avsatt mot tid)



Figur 1b

Exempel på ett halvlogaritmiskt diagram över data (ln kvarvarande aktivitet avsatt mot tid)



▼M6

C.26 BESTÄMNING AV TILLVÄXTHÄMNING HOS *LEMNA*-ARTER (ANDMAT)

INLEDNING

1. Denna testmetod motsvarar OECD:s testriktlinje (TG) 221 (2006). Den är avsedd för bestämning av kemikaliers toxicitet för sötvattensväxter av släktet *Lemna* (andmat). Den bygger på befintliga metoder (1) (2) (3) (4) (5) (6), men har modifierats på några viktiga punkter i enlighet med nya forskningsrön och till följd av samråd. Testmetoden har validerats genom ett internationellt ringtest, dvs. en testjämförelse mellan olika laboratorier i världen (7).

2. Metoden används för toxicitetstest på arterna *Lemna gibba* och *Lemna minor*. Båda dessa arter har studerats ingående och använts i test med de standardmetoder som det hänvisas till ovan. Taxonomin för *Lemna* spp. är komplicerad på grund av mångfalden fenotyper. Hos *Lemna* kan responsen på toxiska substanser variera p.g.a. genetiska skillnader, men för närvarande finns det inte tillräckligt med data om denna källa till variation för att man ska kunna rekommendera en bestämd klon för användning i den aktuella testmetoden. Observera att testet inte utförs axeniskt (dvs. med en monokultur fri från infektion av mikroorganismer), men åtgärder vidtas vid ett antal tillfällen under testets gång för att hålla kontaminationen från andra organismer så låg som möjligt.

3. Dokumentet innehåller ingående beskrivningar av testförfaranden med regelbunden förnyelse av testlösningar (semistatiskt test och genomflödestest) och utan förnyelse av testlösningar (statiskt test). Beroende på lagstadgade krav och syftet med testet kan semistatiskt test eller genomflödestest komma i fråga i vissa fall, t.ex. för kemikalier som snabbt försvinner ur lösningen genom avdunstning, ljusnedbrytning, utfällning eller bionedbrytning. Närmare riktlinjer finns i (8).

4. De definitioner som används finns i tillägg 1.

PRINCIP FÖR TESTMETODEN

5. Exponentiellt växande växtkulturer av släktet *Lemna* får växa som monokulturer i olika koncentrationer av testkemikalien under loppet av sju dagar. Syftet är att genom bestämning av utvalda mätvariabler kvantifiera testkemikaliens effekter på tillväxten under tiden för testets genomförande. Antalet fronder är den primära mätvariabeln. Minst ytterligare en mätvariabel – total frondarea, torrvikt eller färskvikt – mäts, eftersom en del kemikalier kan påverka andra mätvariabler mer än de påverkar frondantalet. För att kvantifiera testkemikaliens effekter jämförs tillväxten i testlösningarna med tillväxten i kontrollerna. Därefter bestäms den koncentration som åstadkommer en bestämd procent (x) av tillväxthämning, t.ex. 50 %. Denna koncentration betecknas som EC_x, t.ex. EC_{50} i fallet med 50 % tillväxthämning.

6. Endpoint i testet är tillväxthämning, uttryckt som den logaritmiska ökningen av mätvariabeln (den genomsnittliga specifika tillväxthastigheten) under exponeringstiden. Från de genomsnittliga specifika tillväxthastigheter som uppmätts i en serie testlösningar fastställer man den koncentration av testkemikalien som ger upphov till en specificerad minskning av tillväxthastigheten, x % (t.ex. 50 %). Värdet uttrycks som E_rC_x (t.ex. E_rC_{50}).

7. I den här testmetoden används även producerad mängd biomassa som responsvariabel, något som kan vara nödvändigt för att uppfylla gällande krav i vissa länder. Den definieras som storleken på en mätvariabel vid exponeringstidens slut minus storleken på samma mätvariabel vid exponeringstidens början. Med utgångspunkt i den mängd biomassa som producerats i en serie testlösningar beräknar man den koncentration av testkemikalien som ger upphov till en viss, fastställd minskning av mängden producerad biomassa, x % (t.ex. 50 %). Detta värde uttrycks som E_yC_x (t.ex. E_yC_{50}).

▼M6

8. Den lägsta koncentrationen med observerad effekt (LOEC) och den högsta koncentrationen utan observerad effekt (NOEC) kan också bestämmas statistiskt.

INFORMATION OM TESTKEMIKALIEN

9. Man bör ha tillgång till en analysmetod som är tillräckligt känslig för kvantitetsbestämning av testkemikalien i testmediet.

10. Bland annat följande uppgifter om testkemikalien kan vara av värde när man fastställer testbetingelserna: strukturformel, renhetsgrad, vattenlöslighet, stabilitet i vatten och ljus, pK_a, K_{ow}, ångtryck och bionedbrytbarhet. Löslighet i vatten och ångtryck kan användas för att beräkna Henrys konstant, som visar om det är sannolikt att förlusterna av testkemikalien under testets genomförande kommer att vara betydande. Detta ger en indikation på om man behöver vidta åtgärder för att kontrollera dessa förluster. Om uppgifterna om testkemikaliens löslighet och stabilitet är osäkra, bör man bedöma dessa egenskaper under testbetingelserna, dvs. i det odlingsmedium, vid den temperatur och under de belysningsförhållanden som används i testet.

11. När det är särskilt viktigt att reglera testmediets pH, t.ex. vid test av hydrolytiskt instabila metaller eller kemikalier (dvs. sådana som bryts ned i vatten), bör man tillsätta en buffert i odlingsmediet (se punkt 21). Närmare vägledning för testning av kemikalier vars fysikalisk-kemiska egenskaper gör dem svåra att testa finns i (8).

TESTETS GILTIGHET

12. För att testresultaten ska vara giltiga måste fördubblingstiden för frondantalet i kontrollen vara mindre än 2,5 dagar (60 timmar). Det motsvarar en ökning på ca 700 % på 7 dagar och en genomsnittlig specifik tillväxthastighet på 0,275 d^{-1}. Med de testmedier och testbetingelser som beskrivs för den aktuella testmetoden kan detta kriterium uppfyllas med ett statiskt testförfarande (5). Kriteriet bör också kunna uppfyllas vid semistatiskt testförfarande och genomflödestest. Beräkningen av fördubblingstiden beskrivs i punkt 49.

REFERENSKEMIKALIE

13. Referenskemikalie(r), t.ex. 3,5-diklorfenol, som används i det internationella ringtestet (7), kan testas för att kontrollera testförfarandet. Det är lämpligt att testa en referenskemikalie minst två gånger per år eller, om testen utförs mer sällan, parallellt med fastställandet av en testkemikalies toxicitet.

BESKRIVNING AV TESTMETODEN

Utrustning

14. All utrustning som befinner sig i kontakt med testmedier ska vara av glas eller annat kemiskt inert material. Glasutrustning som används för odling och test ska vara rengjord från kemiska föroreningar som kan läcka in i testmediet, och glaset ska vara sterilt. Provkärlen ska vara så vida att fronderna från de olika kolonierna i kontrollerna kan växa utan att de täcker varandra i slutet av testet. Det gör inget om rötterna vidrör botten av provkärlen, men alla provkärl bör vara minst 20 mm djupa och ha en volym på minst 100 ml. Så länge dessa krav är uppfyllda har valet av provkärl ingen avgörande betydelse. Glasbägare och kristalliseringsskålar samt petriskålar av glas – alla med passande storlekar – har alla visat sig vara lämpliga. Provkärlen måste vara tillslutna för att avdunstning och oavsiktlig kontamination ska

▼M6

hållas så låg som möjlig, samtidigt som erforderlig luftväxling ska vara möjlig. Provkärlen – framför allt lock, proppar eller andra typer av förslutningar – måste vara sådana att det inte förekommer någon skuggverkan eller förändringar av ljusets spektrala egenskaper.

15. Odlingar och provkärl får inte förvaras tillsammans. Bäst är att använda separata klimatodlingskammare, inkubatorer eller klimatrum. Belysning och temperatur måste kunna regleras och hållas på konstant nivå (se punkterna 35–36).

Testorganism

16. Som organism för testet används *Lemna gibba* eller *Lemna minor*. Tillägg 2 innehåller kortfattade beskrivningar av andmatsarter som har använts för toxicitetstest. Växtmaterial kan tas från en kultursamling, införskaffas från ett annat laboratorium eller samlas in i naturen. Innan de används ska plantor som samlats in i naturen hållas i samma medium som används för testet under minst åtta veckor. Det får inte finnas några uppenbara kontaminationskällor på platser som används för insamling i naturen. Växtmaterial som införskaffas från andra laboratorier eller från kultursamlingar ska förvaras under minst tre veckor på samma sätt som plantor från naturen. Om ursprunget är känt ska detta alltid redovisas för växtmaterialet, de arter och den klon som används för testet.

17. Man ska använda monokulturer utan synliga föroreningar i form av andra organismer såsom alger och protozoer. Friska plantor av *L. minor* består av kolonier med mellan två och fem fronder, medan friska kolonier av *L. gibba* kan omfatta upp till sju fronder.

18. Kvaliteten och enhetligheten hos plantorna som används för testet har stor betydelse för testresultatet, och de bör därför väljas ut med omsorg. Man bör använda unga, snabbväxande plantor utan synliga skador eller missfärgningar (p.g.a. kloros). Att en kultur är av god kvalitet kännetecknas av att den har en stor andel kolonier med minst två fronder. Ett stort antal enstaka fronder är ett tecken på miljöstress, t.ex. på grund av näringsbrist. Växtmaterial från sådana kulturer bör inte användas för tester.

Odling

19. För att göra odlingen mindre arbetskrävande – t.ex. när inga test av *Lemna* är inplanerade under en längre tid – kan kulturerna förvaras under reducerad belysning och temperatur (4–10 °C). Uppgifter om behandling av stamkulturer finns i tillägg 3. Om det finns tydliga tecken på föroreningar i form av alger eller andra organismer krävs ytsterilisering av ett delprov av fronder från *Lemna*. Detta förs sedan över till ett färskt medium (se tillägg 3). I detta fall måste den återstående delen av den kontaminerade kulturen kasseras.

20. Minst sju dagar före testet förs en tillräcklig mängd kolonier aseptiskt över till färskt medium och odlas under 7–10 dagar under testbetingelser.

Testmedium

21. För *Lemna minor* och *Lemna gibba* rekommenderas olika medier (se nedan). Man bör noggrant överväga om man ska tillsätta en pH-buffert i testmediet (MOPS (4-morfolinopropansulfonsyra, CAS-nr 1132-61-2) i mediet för *L. minor* och $NaHCO_3$ i mediet för *L. gibba*) när man misstänker att mediet kan reagera med testkemikalien och påverka dess toxicitetseffekt. Steinbergs medium (9) kan också användas förutsatt att kriterierna för testresultatens giltighet är uppfyllda.

▼M6

22. En modifierad form av det odlingsmedium för *Lemna* som är standardiserat av det svenska standardiseringsorganet SIS rekommenderas för odling av och test med *L. minor*. Sammansättningen av detta medium återfinns i tillägg 4.

23. Odlingsmediet 20X-AAP, som beskrivs i tillägg 4, rekommenderas för odling av och test med *L. gibba*.

24. Steinbergs medium, som beskrivs i tillägg 4, passar också för *L. minor* men kan också användas för *L. gibba* så länge kriterierna för testresultatens giltighet är uppfyllda.

Testlösningar

25. Testlösningarna bereds vanligtvis genom utspädning av en stamlösning. Stamlösningar av testkemikalien bereds normalt genom att kemikalien löses upp i ett odlingsmedium.

26. Den högsta koncentrationen av testkemikalien bör normalt inte överskrida dess vattenlöslighet under testbetingelserna. Observera dock att *Lemna* spp. flyter på vätskeytan och kan exponeras för kemikalier som samlas i gränsytan mellan vatten och luft, t.ex. hydrofoba eller ytaktiva kemikalier eller kemikalier med låg vattenlöslighet. Under sådana omständigheter kommer plantan att exponeras för andra koncentrationer av kemikalien än de som förekommer i lösningen. Koncentrationerna kan därför – beroende på testkemikaliens egenskaper – överskrida vattenlösligheten. För testkemikalier med låg vattenlöslighet kan det bli nödvändigt att bereda en koncentrerad stamlösning eller en dispersion med hjälp av ett organiskt lösningsmedel eller dispergeringsmedel för att underlätta tillsatsen av exakta mängder testkemikalie i testmediet och bidra till dispergeringen och upplösningen av kemikalien. Man bör därför så långt som möjligt undvika att använda sådana ämnen. Det får inte uppstå fytotoxicictet på grund av att man tvingas använda lösnings- eller dispergeringsmedel för att bereda testlösningen. Exempel på vanliga lösningsmedel som inte förorsakar fytotoxicitet vid koncentrationer upp till 100 µl/l är aceton och dimetylformamid. Om ett lösnings- eller dispergeringsmedel används bör dess slutkoncentration redovisas och hållas så låg som möjligt (≤ 100 µl/l). Alla test- och kontrollösningar bör ha samma koncentration av lösnings- eller dispergeringsmedel. Mer information om användningen av dispergeringsmedel finns i (8).

Test- och kontrollgrupper

27. Förkunskap om testkemikaliens toxicitet för *Lemna*, t.ex. erhållen genom ett preliminärt test av koncentrationsintervallet för toxiciteten, underlättar valet av lämpliga testkoncentrationer. I det slutliga toxicitetstestet ska det normalt finnas minst fem koncentrationer ordnade i geometrisk serie. Separationsfaktorn mellan testkoncentrationerna bör inte överskrida 3,2, men om dos-respons-kurvan är flack kan en större separationsfaktor användas. Om färre än fem koncentrationer används måste detta motiveras. Minst tre replikat ska användas för respektive testkoncentration.

28. När man fastställer intervallet av testkoncentrationer (för det preliminära testet eller för det slutliga toxicitetstestet), ska man beakta följande:

— För att bestämma en EC_x-koncentration ska värdet på EC_x ligga innanför intervallet för testkoncentrationerna för att man ska uppnå en lämplig konfidensgrad. Om man t.ex. ska bestämma EC_{50} ska den högsta testkoncentrationen vara högre än värdet på EC_{50}. Om värdet på EC_{50} ligger utanför intervallet för testkoncentrationerna blir motsvarande konfidensintervall stora, och det kan då bli omöjligt att korrekt bedöma modellens statistiska lämplighet.

— Om syftet är att bestämma LOEC eller NOEC ska den lägsta testkoncentrationen vara så låg att tillväxten inte är märkbart mindre än tillväxten i kontrollen. Den högsta testkoncentrationen ska vara så hög att tillväxten är märkbart lägre än i kontrollen. Om dessa villkor inte är

▼M6

uppfyllda måste testet göras om med ett annat koncentrationsintervall (såvida inte den högsta koncentrationen ligger på löslighetsgränsen eller är lika med den högsta erforderliga gränskoncentrationen, t.ex. 100 mg/l).

29. I varje test ska ingå kontroller med samma näringsmedium, frondantal, antal kolonier, miljöbetingelser och förfaranden som för provkärlen, men utan testkemikalien. Om ett lösnings- eller dispergeringsmedel används som hjälpmedel i testet krävs ytterligare ett kontrollprov, nu med samma koncentration av lösnings- eller dispergeringsmedlet som i provkärlen med testkemikalien. Antalet replikatkärl med kontroller – och i tillämpliga fall kärl med lösnings- eller dispergeringsmedel – ska vara minst lika med, eller helst dubbelt så många som, antalet kärl som används för respektive testkoncentration.

30. Om NOEC inte behöver bestämmas kan man ändra testupplägget så att antalet koncentrationer ökas medan antalet replikat per koncentration minskas. Antalet kontrollreplikat måste dock vara minst tre.

Exponering

31. Kolonier med 2–4 synliga fronder förs över från ympkulturen och fördelas slumpmässigt i provkärlen under aseptiska förhållanden. Alla provkärl ska innehålla sammanlagt 9–12 fronder vardera. Antalet fronder och kolonier ska vara detsamma i alla provkärl. Erfarenheter från användning av denna metod och resultat från ringtest har visat att tre replikat per testlösning (testkoncentration), där alla replikat från början innehåller 9–12 fronder, är tillräckligt för att man ska upptäcka skillnader i tillväxt mellan testlösningarna på cirka 4–7 procents tillväxthämning (beräknad enligt tillväxthastighet) och 10–15 procents tillväxthämning (beräknad enligt producerad mängd biomassa) (7).

32. Provkärlen måste placeras slumpmässigt i inkubatorn för att minimera inflytandet av rumsbetingade skillnader i ljusintensitet och temperatur. Det krävs också blockvis fördelning eller slumpmässig omplacering av kärlen vid varje mättillfälle, eller oftare.

33. Om ett preliminärt stabilitetstest visar att koncentrationen av testkemikalien inte kan upprätthållas (dvs. den uppmätta koncentrationen sjunker under 80 % av den uppmätta startkoncentrationen) under tiden för testets genomförande (7 dagar), bör ett semistatiskt testförfarande användas. I det fallet exponeras kolonierna för nyberedda test- och kontrollösningar vid minst två tillfällen under testet, t.ex. på dag tre och dag fem. Intervallen för byte till färskt medium beror på stabiliteten hos testkemikalien. Det kan krävas kortare intervall för att upprätthålla nära nog konstanta koncentrationer av mycket instabila eller flyktiga kemikalier. I visa fall måste man använda genomflödestest (8)(10).

34. Exponering genom besprutning av fronderna ingår inte i denna testmetod; se istället (11).

Inkuberingsförhållanden

35. Kontinuerlig belysning med varmt eller kallt vitt ljus från lysrör används för att åstadkomma en ljusintensitet i intervallet 85–135 $\mu E \cdot m^{-2} s^{-1}$, varvid intensiteten ska mätas inom ett fotosyntetiskt aktivt våglängdsområde (400–700 nm) i punkter på samma avstånd från ljuskällan som *Lemna*-fronderna (denna intensitet motsvarar en belysningsstyrka på 6 500–10 000 lux). Ljusintensiteten över testytan får inte variera med mer än ± 15 %. Metoden för detektering och mätning av ljuset, framför allt typen av ljussensor, påverkar mätvärdet. Sfäriska sensorer – som mäter ljuset från alla vinklar

▼M6

ovanför och under mätplanet – och sensorer av solsensortyp (med cosinuskoefficient för infallsvinkeln) – som mäter ljuset från alla vinklar ovanför mätplanet – är att föredra framför riktade sensorer. De förstnämnda sensorerna ger större mätutslag för en diffus ljuskälla av den typ som beskrivits här.

36. Temperaturen i testkärlen bör vara 24 ± 2 °C. Kontrollmediets pH får inte öka med mer än 1,5 enheter under testet. En avvikelse på mer än 1,5 gör dock inte testresultaten ogiltiga om det kan visas att kriterierna för testresultatens giltighet är uppfyllda. I speciella fall, t.ex. vid test av instabila kemikalier eller metaller, måste förskjutningen av pH kontrolleras extra noggrant. Se vidare (8).

Varaktighet

37. Testet ska avslutas sju dagar efter det att plantorna har placerats i provkärlen.

Mätningar och analytiska bestämningar

38. Räkna och registrera frondantalet i provkärlen vid testets början. Se noga till att ta med alla uppstickande, väl synliga fronder. Bestäm antalet fronder – både sådana som framstår som normala och sådana som framstår som onormala – vid början av testet och därefter minst var tredje dag under exponeringstiden (dvs. vid minst två tillfällen under sjudagarsperioden), samt när testet avslutas. Registrera förändringar i plantutvecklingen. Det kan t.ex. gälla frondstorlek, utseende, tecken på nekros, kloros eller svullna fronder, kollaps av kolonier eller försämrad flytförmåga samt rötternas längd och utseende. Registrera också betydelsefulla iakttagelser från testmediet, t.ex. förekomst av oupplöst material och algtillväxt i provkärlet.

39. Utöver bestämningar av frondantalet under testet ska de effekter testkemikalien har på en eller flera av följande mätvariabler bestämmas:

(i) Total frondarea.

(ii) Torrvikt.

(iii) Färskvikt.

40. Fördelen med variabeln ”total frondarea” är att den kan bestämmas för alla prov- och kontrollkärl vid början, under och vid slutet av testet. Torr- eller färskvikt måste bestämmas vid början av testet med hjälp av ett prov från ympkulturen som är representativt för vad som används för att starta testet, och vid slutet av testet med hjälp av växtmaterial från alla prov- och kontrollkärl. Om frondarean inte bestäms är det bättre att fastställa torrvikten än färskvikten.

41. Total frondarea, torrvikt och färskvikt kan bestämmas på följande sätt:

(i) *Total frondarea:* Den sammanlagda frondarean hos alla kolonier bestäms genom bildanalys. Med en videokamera registrerar man en silhuett av provkärlet och plantorna (kärlet kan t.ex. placeras på en ljuslåda). Därefter digitaliseras bilderna. Genom kalibrering med plana former med känd area kan man sedan bestämma den totala frondarean i kärlet. Fel orsakade av inverkan av provkärlets överkant måste undvikas. En annan, mer arbetskrävande metod är att ta en fotokopia av provkärlet och plantorna, klippa ut den silhuett som kolonierna bildar och sedan bestämma deras area med hjälp av en bladytemätare eller ett millimeterpapper. Andra metoder – t.ex. bestämning av viktförhållandet mellan koloniernas silhuettyta och en ytenhet – kan också vara ändamålsenliga.

▼M6

(ii) *Torrvikt:* Alla kolonier samlas in från respektive provkärl och sköljs med destillerat eller avjonat vatten. Överskottsvattnet avlägsnas från kolonierna, t.ex. genom uppsugning med filterpapper, och de torkas sedan vid 60 °C tills vikten inte längre minskar. Även rotfragment måste tas med. Torrvikten bestäms med en noggrannhet på minst 0,1 mg.

(iii) *Färskvikt:* Alla kolonier förs över till förvägda provrör av polystyren (eller annat inert material) med små (1 mm) hål i de rundade bottnarna. Provrören centrifugeras vid 3 000 varv/minut under 10 minuter vid rumstemperatur. Provrören, som nu innehåller torra kolonier, vägs på nytt. Färskvikten fås fram genom att subtrahera det tomma provrörets vikt.

Mätfrekvens och analytiska bestämningar

42. Vid statiskt testförfarande ska pH-värdet i alla testlösningar (testkoncentrationer) mätas vid början och slutet av testet. Vid semistatiskt testförfarande mäts pH-värdet i varje färsk testlösning innan byte till ny lösning och i motsvarande förbrukade lösning.

43. Ljusintensiteten ska mätas i odlingskammaren, inkubatorn eller klimatrummet i punkter på samma avstånd från ljuskällan som *Lemna*-fronderna. Mätningar ska göras minst en gång under testets genomförande. Temperaturen hos mediet i ett ersättningskärl med enbart testmedium som hålls under samma betingelser i odlingskammaren, inkubatorn eller klimatrummet ska registreras minst en gång per dag.

44. Under testets gång ska testkemikaliens koncentrationer bestämmas med lämpliga intervaller. Vid ett statiskt testförfarande är minimikravet att koncentrationerna ska bestämmas vid början och slutet av testet.

45. Om man vid ett semistatiskt testförfarande bedömer att koncentrationen av testkemikalien inte kommer att ligga kvar inom ± 20 % av den nominella koncentrationen, måste man analysera alla nyberedda testlösningar liksom alla förbrukade lösningar vid byte till ny färsk lösning (se punkt 33). För test i vilka den uppmätta startkoncentrationen av testkemikalien inte ligger inom ± 20 % av den nominella koncentrationen men tillräckliga bevis kan framläggas för att visa att startkoncentrationerna är repeterbara och stabila (dvs. inom intervallet 80–120 % av startkoncentrationen), räcker det om kemiska bestämningar utförs enbart för de högsta och lägsta testkoncentrationerna. I samtliga fall behöver bestämning av testkemikaliens koncentrationer före byte till färsk testlösning bara utföras på ett enda replikatkärl för varje testkoncentration (eller på det samlade innehållet från samtliga replikat för respektive testkoncentration).

46. Vid genomflödestest kan man använda ett liknande förfarande som vid ett semistatiskt testförfarande – inklusive analys vid början, halvvägs igenom testet och vid slutet av testet – men i detta fall har mätning av förbrukade lösningar inte någon relevans. Vid genomflödestest ska daglig kontroll göras av flödeshastigheten hos spädningsmedlet och testkemikalien, eller hos stamlösningen av testkemikalien.

47. Om man kan visa att testkemikaliens koncentration har hållits tillfredsställande inom ± 20 % av den nominella eller uppmätta startkoncentrationen genom hela testet kan analysen av resultaten baseras på nominella eller uppmätta startvärden. Om avvikelsen från den nominella eller uppmätta startkoncentrationen inte ligger inom ± 20 %, ska analysen av resultaten baseras på det geometriska medelvärdet av koncentrationen under exponeringen, eller på modeller som beskriver testkemikaliens avtagande koncentration (8).

▼M6

Toleranstest

48. Under vissa omständigheter, t.ex. när ett preliminärt test tyder på att testkemikalien inte har några toxiska effekter vid koncentrationer upp till 100 mg/l eller upp till dess löslighetsgräns i testmediet (om denna är lägre), kan man utföra ett toleranstest. Man jämför då responsen mellan en kontrollgrupp och en testgrupp (med en koncentration på 100 mg/l eller lika med löslighetsgränsen). Det rekommenderas starkt att jämförelsen kompletteras med en bestämning av exponeringskoncentrationen. Alla testbetingelser samt kriterier för testresultatens giltighet som beskrivits tidigare gäller även för toleranstest, med undantaget att antalet testreplikat ska vara dubbelt så stort. Tillväxten i kontrollgruppen och testgruppen kan analyseras med en statistisk metod för jämförelse av medelvärden, t.ex. t-test (Students t-test).

DATA OCH RAPPORTERING

Fördubblingstid

49. Fördubblingstiden (T_d) för frondantalet är ett kriterium på testresultatens giltighet (se punkt 12). Den bestäms genom att infoga data från kontrollkärlen i följande formel:

$$T_d = \ln 2/\mu$$

där μ är den genomsnittliga specifika tillväxthastigheten enligt beskrivningen i punkterna 54–55.

Responsvariabler

50. Syftet med testet är att bestämma testkemikaliens effekter på tillväxten av *Lemna*. I denna testmetod används två responsvariabler, eftersom olika jurisdiktioner har olika prioriteringar och lagstiftningsbehov. För att testresultaten ska kunna godtas i alla jurisdiktioner ska effekterna bedömas med hjälp av båda de responsvariabler (a och b) som beskrivs nedan.

(a) *Genomsnittlig specifik tillväxthastighet:* Denna beräknas med hjälp av två variabler: 1) den tidsmässiga förändringen av det logaritmiska värdet av frondantalet, och 2) den tidsmässiga förändringen av det logaritmiska värdet av en andra variabel, som kan vara total frondarea, torrvikt eller färskvikt. Förändringarna bestäms i kontrollerna och respektive testgrupp. Tiden uttrycks i dagar. Denna responsvariabel kallas ibland relativ tillväxthastighet (12).

(b) *Producerad mängd biomassa:* Denna beräknas med hjälp av förändringarna av frondantalet och förändringarna av en andra variabel, som kan vara total frondarea, torrvikt eller färskvikt. Förändringarna bestäms i kontrollerna och respektive testgrupp ända till slutet av testet.

51. Observera att toxicitetsvärden som beräknats utifrån de två responsvariablerna inte är jämförbara, och att denna skillnad måste framgå när man tillämpar testresultaten. EC_x-värden som grundar sig på den genomsnittliga specifika tillväxthastigheten (E_rC_x) är i allmänhet högre än de som grundar sig på den producerade mängden biomassa (EyC_x) förutsatt att testmetodens föreskrivna testbetingelser är uppfyllda, på grund av de matematiska förutsättningarna för respektive metod. Detta ska dock inte tolkas som skillnader i känslighet mellan de två responsvariablerna. Avvikelserna beror i stället på att värdena är olika ur matematisk synvinkel. Variabeln genomsnittlig specifik tillväxthastighet grundar sig på den allmänna exponentiella tillväxtutvecklingen hos andmat i obegränsade kulturer, där toxiciteten bestäms på basis av testkemikaliens inverkan på tillväxthastigheten, oberoende av den absoluta nivån på den specifika tillväxthastigheten i kontrollen, dos-responskurvans lutning och tiden för testets genomförande. Resultat som i stället grundar sig på producerad mängd biomassa är däremot beroende av alla dessa övriga variabler. E_yC_x är beroende både av den specifika tillväxthastigheten hos de andmatsarter som används i varje enskilt test och av den

▼M6

maximala specifika tillväxthastigheten, som kan variera mellan olika arter och till och med mellan olika kloner. Denna responsvariabel får inte användas för jämförelser av känsligheten för toxiska substanser mellan olika andmatsarter, inte ens mellan olika kloner. Ur vetenskaplig synpunkt är värdet på den genomsnittliga specifika tillväxthastigheten att föredra för bestämning av toxiciteten, men toxicitetsbestämning med hjälp av värdet på producerad mängd biomassa har tagits med i testmetoden för att tillgodose de nuvarande lagstiftningskraven i vissa jurisdiktioner.

52. Toxiciteten ska bestämmas med hjälp av frondantalet och ytterligare en mätvariabel (total frondarea, torrvikt eller färskvikt), eftersom vissa kemikalier kan påverka andra mätvariabler mycket mer än de påverkar frondantalet. Om man bara höll sig till frondantalet skulle man inte märka denna påverkan.

53. Frondantalet samt övriga registrerade mätvariabler för respektive mättillfälle, t.ex. total frondarea, torrvikt eller färskvikt, förs in i en tabell tillsammans med koncentrationerna av testkemikalien. De efterföljande beräkningarna för att bestämma t.ex. LOEC, NOEC eller EC_x ska grundas på värdena för de enskilda replikaten, inte på beräknade medelvärden för respektive testgrupp.

Genomsnittlig specifik tillväxthastighet

54. Den genomsnittliga specifika tillväxthastigheten för en given tidsperiod beräknas som den logaritmiska ökningen av två tillväxtvariabler: frondantal och ytterligare en mätvariabel (total frondarea, torrvikt eller färskvikt). Använd nedanstående formel för alla replikat av kontroll- och testlösningar:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln (N_j) - \ln (N_i)}{t}$$

där

— μ_{i-j} är genomsnittlig specifik tillväxthastighet från tidpunkten i till tidpunkten j,

— N_i är värdet på mätvariabeln i prov- respektive kontrollkärlet vid tidpunkten i,

— N_j är värdet på mätvariabeln i prov- respektive kontrollkärlet vid tidpunkten j, och

— t är tidslängden mellan tidpunkterna i och j.

Beräkna ett medelvärde av tillväxthastigheten för varje testgrupp och kontrollgrupp tillsammans med variansskattningar.

55. Den genomsnittliga specifika tillväxthastigheten ska beräknas för hela tiden för testets genomförande (”i” i formeln betecknar början av tiden för testets genomförande, och ”j” slutet). Beräkna ett medelvärde av den genomsnittliga tillväxthastigheten för varje testkoncentration och kontrollgrupp tillsammans med variansskattningar. Bestäm dessutom den sektionsvisa tillväxthastigheten för att kunna bedöma testkemikaliens effekter under exponeringstiden (t.ex. genom analys av logaritmiska tillväxtkurvor). Stora skillnader mellan den sektionsvisa tillväxthastigheten och den genomsnittliga tillväxthastigheten tyder på att tillväxten inte varit konstant exponentiell. I sådana fall bör tillväxtkurvorna undersökas noggrant. Vid en konservativ bedömning kan man i detta fall jämföra testlösningarnas specifika tillväxthastigheter under det tidsintervall som har den största tillväxthämningen med tillväxthastigheterna för kontrollerna under samma tidsintervall.

56. Den procentuella tillväxthämningen (I_r) beräknas sedan för varje testkoncentration (testgrupp) med formeln

▼M6

$$\%\ I_r = \frac{(\mu C - \mu T)}{\mu C} \times 100$$

där

— % I_r: är den procentuella minskningen av den genomsnittliga specifika tillväxthastigheten,

— μ_C: är medelvärdet av μ i kontrollgruppen, och

— μ_T: är medelvärdet av μ i testgruppen.

Producerad mängd biomassa

57. Effekterna på den producerade mängden biomassa bestäms med hjälp av två mätvariabler, varav den ena är frondantalet och den andra någon av variablerna total frondarea, torrvikt eller färskvikt. Mätningarna görs vid början och slutet av testet. För torrvikt och färskvikt bestäms den initiala biomassan med hjälp av ett prov bestående av fronder från samma kultur som används för att ympa provkärlen (se punkt 20). Beräkna ett medelvärde av den producerade mängden biomassa för varje testkoncentration och kontrollgrupp tillsammans med variansskattningar. Den genomsnittliga procentuella minskningen av den producerade mängden biomassa (%I_y) beräknas för varje testgrupp med formeln

$$\%\ I_y = \frac{(b_c - b_T)}{b_c} \times 100$$

där

— %I_y är den procentuella minskningen av den producerade mängden biomassa,

— b_C är den slutliga biomassan minus den initiala biomassan för kontrollgruppen, och

— b_T är den slutliga biomassan minus den initiala biomassan för testgruppen.

Plottning av dos-respons-kurvor

58. Dos-respons-kurvor ska plottas som visar förhållandet mellan den genomsnittliga procentuella hämningen av responsvariabeln (I_r eller I_y, beräknad enligt punkt 56 eller 57) och logaritmen för testkemikaliens koncentration.

Bestämning av EC_x

59. Bestämningar av EC_x – t.ex. EC_{50} – ska baseras både på genomsnittlig specifik tillväxthastighet (E_rC_x) och på producerad mängd biomassa (E_yC_x). De sistnämnda två responsvariablerna ska i sin tur bestämmas med hjälp av frondantal och en ytterligare mätvariabel (total frondarea, torrvikt eller färskvikt). Detta beror på att det finns testkemikalier vars inverkan på frondantalet skiljer sig från deras inverkan på andra mätvariabler. Toxicitetsparametrarna bör därför vara fyra EC_x-värden för varje beräknad tillväxthämningsnivå x: E_rC_x (frondantal), E_rC_x (total frondarea, torrvikt eller färskvikt), E_yC_x (frondantal) och E_yC_x (total frondarea, torrvikt eller färskvikt).

Statistisk behandling

60. Målet är att bestämma det kvantitativa förhållandet mellan koncentration och respons med hjälp av regressionsanalys. Man kan använda viktad linjär regression efter att ha gjort en linjär transformation av responsdata, t.ex. till probit-, logit- eller Weibullvärden (13). Icke-linjära regressionsmetoder är dock att föredra, eftersom de är bättre anpassade för att hantera oundvikliga oregelbundenheter i data och avvikelser från jämna fördelningskurvor. I närheten av nollpunkten (ingen tillväxthämning) och fullständig tillväxthämning kan sådana oregelbundenheter bli uppförstorade genom linjäriseringen och därigenom störa analysen (13). Observera att standardmetoder för analys med probit-, logit- eller Weibulltransformationer är avsedda för dikotoma data (dvs. tvåpunktsfördelade data, såsom dödlighet–överlevnad) och därför

▼M6

måste modifieras för att kunna användas för data rörande tillväxthastighet eller producerad mängd biomassa. Speciella metoder för bestämning av EC_x-värden ur kontinuerliga data återfinns i (14), (15) och (16).

61. För varje analyserad responsvariabel används förhållandet mellan koncentration och respons för att göra punktskattningar av EC_x-värden. Om möjligt ska 95-procentiga konfidensgränser bestämmas för varje skattning. Anpassningsgraden (”goodness of fit”) mellan responsdata och regressionsmodellen ska bestämmas antingen grafiskt eller statistiskt. Regressionsanalysen ska göras på responsvärden från enskilda replikat, inte på medelvärden från testgrupper.

62. När tillgängliga regressionsmodeller eller regressionsmetoder inte lämpar sig för de aktuella dataserierna kan skattningar av EC_{50}-värden och konfidensgränser också bestämmas genom linjär interpolation och bootstrapping (17).

63. För skattning av LOEC (och därmed även av NOEC) jämförs medelvärden från testlösningarna med hjälp av variansanalysmetoder (ANOVA). Medelvärdet för varje koncentration jämförs sedan med medelvärdet för kontrollerna med hjälp av en lämplig metod för multipeljämförelse eller trendtest, t.ex. Dunnetts eller Williams test (18) (19) (20) (21). Man måste avgöra om antagandet för ANOVA om varianshomogenitet är uppfyllt. Detta kan göras grafiskt eller med ett etablerat test (22). t.ex. Levenes eller Bartletts test. Skulle antagandet om varianshomogenitet inte vara uppfyllt kan man ibland korrigera för detta genom logaritmisk transformation av data. Om heterogeniteten i variansen är extremt stor och inte kan korrigeras genom transformation, ska man överväga att göra analysen med t.ex. Jonkheeres trendtester av ”step-down”-typ. Mer information om bestämning av NOEC finns i (16).

64. Nya forskningsrön har lett till att man avråder från användning av NOEC-värden. I stället rekommenderas att man använder punktskattningar av EC_x baserade på regressionsanalys. För detta *Lemna*-test har ännu inget passande värde på x fastställts. Ett intervall på 10–20 % förefaller dock vara lämpligt, beroende på vilken responsvariabel som används. Både EC_{10} och EC_{20} bör redovisas.

Rapportering

65. Testrapporten ska innehålla följande uppgifter:

Testkemikalie:

— fysikalisk form (gas, vätska eller fast form) och fysikalisk-kemiska egenskaper, inbegripet löslighetsgräns i vatten,

— kemiska beteckningsuppgifter (t.ex. CAS-nummer), inklusive renhetsgrad (föroreningar).

Testade arter:

— vetenskapligt namn, klon (om denna är känd) och ursprung.

Testbetingelser:

— testförfarande (statiskt, semistatiskt eller genomflöde),

— startdatum och varaktighet för testet,

— testmedium,

— beskrivning av testupplägget: provkärl och lock eller proppar (eller annan typ av förslutning), lösningsvolymer, antal kolonier och fronder per provkärl vid testets början,

— testkoncentrationer (nominella respektive uppmätta värden) och antal replikat per koncentration,

▼M6

— metoder för beredning av stam- och testlösningar, med uppgift om användning av lösnings- eller dispergeringsmedel,

— temperatur under testets gång,

— ljuskälla, ljusintensitet och ljushomogenitet,

— pH-värden i test- och kontrollmedier,

— testkemikaliens koncentrationer och analysmetod med relevanta uppgifter för kvalitetsbedömning (kontroll av testresultatens giltighet, standardavvikelser eller konfidensgränser för analyserna),

— metoder för bestämning av frondantal och andra mätvariabler, t.ex. torrvikt, färskvikt eller frondarea,

— alla avvikelser från denna testmetod.

Resultat:

— rådata: frondantal och andra mätvariabler i alla test- och kontrollprov vid respektive observation och analystillfälle,

— medelvärden och standardavvikelser för respektive mätvariabel,

— tillväxtkurvor för respektive koncentration (bör plottas med logaritmen av mätvariabeln; se punkt 55),

— fördubblingstid och tillväxthastighet i kontrollen beräknade med hjälp av frondantal,

— beräknade responsvariabler för respektive testreplikat, inklusive medelvärden och variationskoefficient för replikaten,

— diagram över förhållandet mellan koncentration och tillväxthämmande effekt,

— uppskattningar av toxiska endpoints för responsvariablerna, t.ex. EC_{50}, EC_{10} och EC_{20} samt dithörande konfidensintervall. Om man räknat fram LOEC- och/eller NOEC-värden ska dessa anges, liksom de statistiska metoder som använts vid beräkningen,

— om ANOVA-metoder har använts: storleken på observerad effekt (t.ex. minsta signifikanta skillnad),

— eventuell tillväxtstimulans som har konstaterats i testlösningarna,

— synliga tecken på fytotoxicitet samt observationer avseende testlösningarna,

— diskussion av resultaten, inbegripet eventuell inverkan på testresultatet som kan tillskrivas avvikelser från denna testmetod.

LITTERATUR

(1) ASTM International. (2003). Standard Guide for Conducting Static Toxicity Test with *Lemna gibba* G3. E 1415-91 (förnyat godkännande 1998), s. 733–742. Återfinns i Annual Book of ASTM Standards, Vol. 11.05 Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides, ASTM, West Conshohocken, PA, USA.

(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. 8 s.

(3) AFNOR – Association Française de Normalisation. (1996). XP T 90-337: Détermination de l'inhibition de la croissance de *Lemna minor*. 10 s.

(4) SIS – Svenska standardiseringsinstitutet (1995). Vattenundersökningar – Bestämning av tillväxthämning (7 dygn) hos flytbladsväxten *Lemna minor*, andmat. SS 02 82 13, 15 s.

▼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, 120 s.

(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) Sims, I., Whitehouse, P. och Lacey, R. (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 för ekonomiskt samarbete och utveckling (OECD), Paris.

(9) Internationella standardiseringsorganisationen. ISO DIS 20079. Vattenundersökningar – Toxicitetsmetod – Bestämning av tillväxthämning hos flytbladsväxten *Lemna minor*, andmat.

(10) Walbridge, C. T. (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) Lockhart, W. L., Billeck, B. N. och Baron, C. L. (1989). (1989). Bioassays with a floating plant (*Lemna minor*) for effects of sprayed and dissolved glyphosate. *Hydrobiologia*, 118/119, 353–359.

(12) Huebert, D.B. och Shay, J.M. (1993). Considerations in the assessment of toxicity using duckweeds. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 12, 481–483.

(13) Christensen, E.R. och Nyholm, N. (1984). Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves. *Env. Sci. Technol*. 19, 713–718.

(14) Nyholm, N., Sørensen, P. S., Kusk, K. O. och Christensen, E. R. (1992). Statistical treatment of data from microbial toxicity tests. *Environ. Toxicol. Chem*. 11, 157–167.

(15) Bruce R. D. och Versteeg D. J. (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 för ekonomiskt samarbete och utveckling (OECD), Paris.

(17) 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.

(18) Dunnett, C. W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with a Control. J. Amer. Statist. Assoc., 50, 1096–1121.

(19) Dunnett, C. W. (1964). New Tables for Multiple Comparisons with a Control. Biometrics, 20, 482–491.

(20) 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.

(21) Williams, D. A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics, 28: 519–531.

(22) Brain, P. och Cousens, R. (1989). An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses. *Weed Research* 29, 93–96.

▼M6

Tillägg 1

Definitioner

Följande definitioner och förkortningar används i denna testmetod:

Biomassa: torrvikt av levande materia i en population. Begreppet biomassa används också i testet för att ange resultatet av alternativa mätmetoder, t.ex. antalet fronder eller deras totala area.

Kemikalie: ett ämne eller en blandning.

Kloros: gulning av bladvävnad.

Klon: en organism eller cell som uppstått från en enskild individ genom asexuell (vegetativ) förökning. Individer från samma klon är därför genetiskt identiska.

Koloni: samling av moder- och dotterfronder (vanligtvis 2–4 stycken) som sitter fast vid varandra. Ibland används termen ”planta”.

EC_x: den koncentration av testkemikalien som är löst i testmediet och som reducerar tillväxten av *Lemna* med x % (t.ex. 50 %) efter en given exponeringstid (som tydligt måste anges om man avviker från den fulla eller normala testperioden). För att entydigt ange om EC-värdet bygger på tillväxthastighet eller producerad mängd biomassa används beteckningen E_rC för tillväxthastighet och E_yC för producerad mängd biomassa, åtföljt av mätvariabeln, t.ex. E_rC (n), där n = ”antal fronder”.

Genomflödestest: test i vilket testlösningarna kontinuerligt ersätts med färsk lösning.

Frond: enskild bladliknande del av andmatsplantans struktur. Det är den minsta enhet, dvs. individ, som har förökningsförmåga.

Svullen frond: frond med ”buckligt” eller svullet utseende.

Tillväxt: ökning av en mätvariabel – t.ex. frondantal, torrvikt, våtvikt eller total frondarea – mätt över tiden för testets genomförande.

Tillväxthastighet (genomsnittlig specifik tillväxthastighet): logaritmisk ökning av mängden biomassa under exponeringstiden.

Lägsta koncentration med observerad effekt (LOEC – ”Lowest Observed Effect Concentration”): den lägsta testade koncentration vid vilken man kan fastställa att testkemikalien har en statistiskt signifikant hämmande effekt på tillväxten (vid $p < 0,05$) efter en given exponeringstid, jämfört med kontrollen. Alla testkoncentrationer ovanför LOEC måste ha skadliga verkningar som är lika stora som eller större än de verkningar som observeras vid LOEC. Om dessa två villkor inte är uppfyllda måste en fullständig förklaring ges till hur man har valt LOEC (och därmed NOEC).

Mätvariabler: alla slags variabler som mäts för att uttrycka testets endpoint med hjälp av en eller flera responsvariabler. I den aktuella metoden används mätvariablerna frondantal, total frondarea, färskvikt och torrvikt.

Monokultur: kultur bestående av en enda art.

Nekros: död frondvävnad. Tecknet på detta är att vävnaden är vit eller vattenindränkt.

Nolleffektkoncentration (NOEC – ”No Observed Effect Concentration”): testkoncentrationen omedelbart under LOEC.

Fenotyp: observerbara egenskaper hos en organism vilka bestäms av interaktionen mellan organismens gener och dess omgivning.

Responsvariabel: variabel för bestämning av toxicitet. Variabeln fås fram genom att olika beräkningsmetoder tillämpas på uppmätta parametrar för biomassa. I den aktuella metoden är tillväxthastighet och producerad mängd biomassa responsvariabler som beräknas med hjälp av mätvariabler såsom frondantal, total frondarea, färskvikt eller torrvikt.

▼M6

Semistatiskt testförfarande (med regelbunden förnyelse av testlösning): test där testlösningen byts med bestämda intervall under testet.

Statiskt testförfarande: testmetod utan regelbunden förnyelse av testlösningen under testet.

Testkemikalie: varje ämne eller blandning som testas med denna testmetod.

Endpoint: den allmänna faktor som genom inverkan av en testkemikalie förändras jämfört med ett kontrollprov utan testkemikalie. I det aktuella testet används endpointen tillväxthämning, som kan uttryckas med olika responsvariabler baserade på en eller flera mätvariabler.

Testmedium: syntetiskt odlingsmedium i vilket testplantorna växer när de exponeras för testkemikalien. Testkemikalien är vanligen löst i testmediet.

Producerad mängd biomassa: värdet på en mätvariabel för biomassa i slutet av exponeringstiden minus motsvarande värde i början av exponeringstiden.

▼M6

Tillägg 2

Beskrivning av *Lemna* spp.

Den vattenväxt som i allmänt språkbruk kallas andmat – *Lemna* spp. – tillhör familjen Lemnaceae, i vilken det ingår ett antal arter med världsvid utbredning. Dessa tillhör fyra släkten. Deras olika utseenden och taxonomi har beskrivits ingående (1) (2). *Lemna gibba* och *L. minor* är vanliga i tempererade zoner och används ofta i toxicitetstester. Bägge arterna lever i vatten med flytande eller nedsänkt skivlik stam (frond). Från mitten av den undre ytan på varje frond utgår en hårfin rot. *Lemna* spp. blommar sällan; plantorna förökar sig i stället vegetativt genom att bilda nya fronder (3). I jämförelse med äldre plantor tenderar de yngre att vara blekare, ha kortare rötter och bestå av två till tre fronder av olika storlek. Egenskaperna hos *Lemna* – liten storlek, enkel uppbyggnad, vegetativ förökning och kort generationstid – gör plantor av detta släkte mycket lämpade för laboratorietester (4) (5).

Eftersom känsligheten för toxisk påverkan sannolikt varierar mellan arterna, godtas enbart jämförelser av känsligheten inom en och samma art.

Exempel på *Lemna*-arter som har använts vid test: Hänvisningar, arter

Lemna aequinoctialis: Eklund, B. (1996). The use of the red alga *Ceramium strictum* and the duckweed *Lemna aequinoctialis* in aquatic ecotoxicological bioassays. Licentiatavhandling 1996:2. Institutionen för systemekologi, Stockholms universitet.

Lemna major: Clark, N. A. (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: 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.

Association Française de Normalisation (AFNOR). (1996). XP T 90-337: Détermination de l'inhibition de la croissance de *Lemna minor*, s. 10.

SIS – Svenska standardiseringsinstitutet. (1995). Vattenundersökningar – Bestämning av tillväxthämning (7 dygn) hos flytbladsväxten *Lemna minor*, andmat. SS 02 82 13, s. 15.

Lemna gibba: ASTM International. (2003). Standard Guide for Conducting Static Toxicity Test with *Lemna gibba* G3. E 1415-91 (förnyat godkännande 1998), s. 733–742.

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.

Lemna paucicostata: Nasu, Y., Kugimoto, M. (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: Clark, J. R. m.fl. (1981). Accumulation and depuration of metals by duckweed (*Lemna perpusilla*). Ecotoxicol. Environ. Saf., 5, 87–96.

Lemna trisulca: Huebert, D. B., Shay, J. M. (1993). Considerations in the assessment of toxicity using duckweeds. Environ. Toxicol. and Chem., 12, 481–483.

Lemna valdiviana: Hutchinson, T.C., Czyrska, H. (1975). Heavy metal toxicity and synergism to floating aquatic weeds. Verh.-Int. Ver. Limnol., 19, 2102–2111.

Lemna-arter för test kan erhållas från följande institutioner:

University of Toronto Culture Collection of Algae and Cyanobacteria
Department of Botany, University of Toronto
Toronto, Ontario, KANADA, M5S 3 B2
Tfn: +1-416-978-3641
Fax: +1-416-978-5878
e-post: jacreman@botany.utoronto.ca

▼**M6**

North Carolina State University
Forestry Dept
Duckweed Culture Collection
Campus Box 8002
Raleigh, NC 27695–8002
USA
Tfn: 001 (919) 515-7572
astomp@unity.ncsu.edu

Institutionen för tillämpad miljövetenskap (ITM), Stockholms universitet
SE-106 91
Stockholm
SVERIGE
Tfn: + 46 8 674 7240
Fax +46 8 674 7636

Umweltbundesamt (UBA)
FG III 3.4
Schichauweg 58
12307 Berlin
TYSKLAND
e-post: lemna@uba.de

LITTERATUR

(1) Hillman, W.S. (1961). The Lemnaceae or duckweeds: A review of the descriptive and experimental literature. The Botanical Review, 27, 221–287.

(2) Landolt, E. (1986). Biosystematic investigations in the family of duckweed (Lemnaceae). Vol. 2. Geobotanischen Inst. ETH, Stiftung Rubel, Zürich, Schweiz.

(3) Björndahl, G. (1982). Growth performance, nutrient uptake and human utilization of duckweeds (*Lemnaceae* family). ISBN 82-991150-0-0. Norges lantbruksvetenskapliga forskningsråd, Universitetet i Oslo.

(4) Wang, W. (1986). Toxicity tests of aquatic pollutants by using common duckweed. Environmental Pollution, Ser B, 11, 1–14.

(5) Wang, W. (1990). Literature review on duckweed toxicity testing. Environmental Research, 52, 7–22.

▼M6

Tillägg 3

Behandling av stamkulturer

Stamkulturer kan förvaras vid låg temperatur (4–10 °C) under lång tid utan att de behöver startas på nytt. Odlingsmediet för *Lemna* kan vara samma som det som används i testen, men för stamkulturer kan andra näringsrika medier användas.

Med jämna mellanrum flyttas ett bestämt antal unga, ljusgröna plantor över aseptiskt till nya odlingskärl med färskt medium. Under de kalla betingelser som här rekommenderas kan subodling utföras i upp till tre månader långa intervaller.

Använd kemiskt rena (syratvättade) och sterila odlingskärl av glas. Hanteringen ska ske med aseptiska metoder. Om stamkulturen kontamineras av t.ex. alger eller svampar måste man vidta åtgärder för att avlägsna de kontaminerande organismerna. För alger och de flesta andra kontaminerande organismer kan detta åstadkommas genom ytsterilisering. Ett prov tas av det kontaminerade växtmaterialet och rötterna skärs av. Materialet skakas om kraftigt i rent vatten och hålls sedan nedsänkt i en lösning med 0,5 volymprocent natriumhypoklorit i mellan 30 sekunder och 5 minuter. Växtmaterialet sköljs sedan med sterilt vatten och flyttas över satsvis till odlingskärl med färskt odlingsmedium. Många fronder dör av denna behandling, särskilt om exponeringstiderna är långa, men en del av de överlevande fronderna bör vara fria från kontamination. Dessa kan sedan användas för att ympa nya kulturer.

▼M6

Tillägg 4

Media

Olika odlingsmedier bör användas för *L. minor* och *L. gibba*. För *L. minor* bör ett medium enligt modifierad svensk standard (SIS) användas, och för *L. gibba* bör 20X-AAP användas. Sammansättningarna av respektive medium visas i nedanstående tabell. Vid beredning av medierna ska kemikalier av reagenskvalitet eller p.a.-kvalitet användas, och vattnet ska vara avjonat.

Odlingsmedium för *Lemna* enligt svensk standard (SIS)

— Sterilisera stamlösningarna I–V i autoklav (120 °C, 15 minuter) eller genom membranfiltrering (porstorlek ca 0,2 μm).

— Sterilisera stamlösning VI (och i tillämpliga fall VII) endast genom membranfiltrering (ej autoklavering).

— Förvara de sterila stamlösningarna kallt och mörkt. Kassera stamlösningarna I–V efter sex månader. Stamlösning VI (och i tillämpliga fall VII) kan lagras i en månad.

Stam-lösning nr	Ämne	Koncentration i stamlösning (g/l)	Koncentration i testmedium (mg/•l)	Testmedium	
				Grund-ämne	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	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 $2H_2O$	0,28	1,4	—	—
VII	MOPS (buffert)	490	490	—	—

Tillsätt följande mängder stamlösningar till 900 ml avjonat vatten för beredning av 1 liter SIS-medium:

▼**M6**

— 10 ml stamlösning I

— 5 ml stamlösning II

— 5 ml stamlösning III

— 5 ml stamlösning IV

— 1 ml stamlösning V

— 5 ml stamlösning VI

— 1 ml stamlösning VII (i tillämpliga fall)

Anmärkning: Ytterligare stamlösning VII (MOPS-buffert) kan behövas för vissa testkemikalier (se punkt 11).

Justera pH till 6,5 ± 0,2 med 0,1 eller 1 mol HCl eller NaOH (beroende på utgångsvärdet). Tillsätt avjonat vatten så att volymen blir 1 liter.

Odlingsmedium 20X-AAP

Bered stamlösningar med sterilt destillerat eller avjonat vatten.

Förvara de sterila stamlösningarna kallt och mörkt. Under dessa förhållanden kan de lagras i minst 6–8 veckor.

Bered fem näringsstamlösningar (A1, A2, A3, B och C) med kemikalier av reagenskvalitet för 20X-AAP odlingsmedium. Tillsätt 20 ml av varje lösning i ca 850 ml avjonat vatten för beredning av odlingsmediet. Justera pH till 7,5 ± 0,1 med 0,1 eller 1 mol HCl eller NaOH (beroende på utgångsvärdet). Tillsätt avjonat vatten så att volymen blir 1 liter. Filtrera sedan mediet genom ett membranfilter med porstorlek på ca 0,2 μm ner i en steril behållare.

Bered odlingsmediet 1–2 dagar före testets genomförande så att pH hinner stabiliseras. Mät pH före testet och justera vid behov genom tillsats av 0,1 eller 1 mol NaOH eller HCl (beroende på utgångsvärdet).

Stam-lösning nr	Ämne	Koncentration i stamlösningen (g/•l) (*)	Koncentration i testmediet (mg/•l) (*)	Testmedium	
				Grund-ämne	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**

Stam-lösning nr	Ämne	Koncentration i stamlösningen (g/•l) (*)	Koncentration i testmediet (mg/•l) (*)	Testmedium	
				Grund-ämne	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

(*) Om inget annat anges

Anm: Den teoretiskt lämpliga slutkoncentrationen av bikarbonat (som gör att det endast krävs en smärre justering av pH) är 15 mg/l, inte 300 mg/l. I den hävdvunna användningen av 20X-AAP, bland annat i ringtestet för denna metod, är koncentrationen 300 mg/l dock etablerad. (I. Sims, P. Whitehouse och 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.)

Steinbergs medium (enligt ISO 20079)

Koncentrationer och stamlösningar

Ett modifierat Steinbergs medium används i ISO 20079 uteslutande för *Lemna minor* (eftersom enbart denna art är tillåten i denna standard). Test har dock visat att goda resultat kan uppnås även med *Lemna gibba*.

Vid beredning av medierna ska kemikalier av reagenskvalitet eller p.a.-kvalitet användas, och vattnet ska vara avjonat.

Bered näringsmediet från stamlösningar eller från ett medium med 10 gånger högre koncentration än testmediet så att mediet får högsta möjliga koncentration utan utfällning.

Tabell 1

pH-stabiliserat Steinbergmedium (modifierat enligt Altenburger)

Komponent		Näringsmedium	
Makroelement	Molmassa	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		Näringsmedium	
Mikroelement	Molmassa	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-dinatriumdihydrat	372,24	1 500,00	4,03

Tabell 2

Stamlösningar (makroelement)

1. Makroelement (koncentrerat 50 ggr)	**g/l**
Stamlösning 1:	
KNO_3	17,50
KH_2PO_4	4,5
K_2HPO_4	0,63
Stamlösning 2:	
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	5,00
Stamlösning 3:	
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	14,75

Tabell 3

Stamlösningar (mikroelement)

2. Mikroelement (koncentrerat 1 000 ggr)	**mg/l**
Stamlösning 4:	
H_3BO_3	120,0
Stamlösning 5:	
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	180,0
Stamlösning 6:	
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	44,0
Stamlösning 7:	
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	180,0
Stamlösning 8:	
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	760,00
EDTA-dinatriumdihydrat	1 500,00

— Stamlösningarna 2 och 3 kan slås samman, liksom 4–7 (beakta då de fastställda koncentrationerna).

▼**M6**

— Sterilisera stamlösningarna i autoklav (121 °C, 20 minuter) eller gör en sterilfiltrering med porstorlek 0,2 μm, så kan de lagras längre. Stamlösning 8 behandlas genom sterilfiltrering med porstorlek 0,2 μm.

Beredning av slutkoncentrationen för ett modifierat Steinbergs medium

— Tillsätt 20 ml av stamlösningarna 1, 2 och 3 (tabell 2) i ca 900 ml avjonat vatten för att undvika utfällning.

— Tillsätt 1,0 ml av stamlösningarna 4, 5, 6, 7 och 8 (tabell 3).

— pH ska vara 5,5 ± 0,2 (justera genom tillsats av minsta möjliga volym NaOH-lösning eller HCl).

— Justera volymen med vatten till 1 000 ml.

— Om stamlösningarna är steriliserade och lämpligt vatten används behövs ingen ytterligare sterilisering. Om slutmediet steriliseras ska stamlösning 8 tillsättas efter autoklavering (121 °C, 20 minuter).

Beredning av modifierat Steinbergmedium (koncentrerat 10 ggr) för temporär lagring

— Tillsätt 20 ml av stamlösningarna 1, 2 och 3 (tabell 2) i ca 30 ml vatten för att undvika utfällning.

— Tillsätt 1,0 ml av stamlösningarna 4, 5, 6, 7 och 8 (tabell 3). Justera volymen med vatten till 100 ml.

— Om stamlösningarna är steriliserade och lämpligt vatten används behövs ingen ytterligare sterilisering. Om slutmediet steriliseras ska stamlösning 8 tillsättas efter autoklavering (121 °C, 20 minuter).

— pH (vid slutkoncentrationen) ska vara 5,5 ± 0,2.

▼M4

C.27 TOXICITETSTEST I SEDIMENT- OCH VATTENFAS PÅ CHIRONOMIDLARVER MED SPIKAT SEDIMENT

INLEDNING

1. Denna testmetod motsvarar OECD:s testriktlinje 218 (2004). Syftet med testmetoden är att bedöma effekterna av långvarig kemikalieexponering på sedimentlevande larver i sötvatten av fjädermyggor *Chironomus* sp. Metoden är baserad på befintliga toxicitetstestprotokoll för *Chironomus riparius och Chironomus tentans* som har tagits fram i Europa (1) (2) (3) och Förenta staterna (4) (5) (6) (7) (8) samt ringtestats (1) (6) (9). Även övriga väldokumenterade chironomider kan användas, t.ex. *Chironomus yoshimatsui* (10) (11).

2. Exponeringsscenariot i denna testmetod går ut på att spika sediment med testämnet. Valet av lämpligt exponeringsscenario beror på den avsedda tillämpningen för testet. Scenariot med spikning av sediment är avsett att simulera ackumulerade nivåer av kemikalier som finns kvar i sedimentet. Detta exponeringssystem innebär spikning av sediment i ett testsystem med sediment- och vattenfas.

3. Ämnen som behöver testas på sedimentlevande organismer är sådana som i allmänhet blir kvar i sedimentet under långa tidsperioder. De sedimentlevande organismerna kan exponeras via ett antal rutter. Den relativa betydelsen av varje exponeringsrutt och den tid det tar för var och en av dem att bidra till de totala toxiska effekterna beror på den berörda kemikaliens fysikalkemiska egenskaper. För starkt adsorberande ämnen (t.ex. log K_{ow} > 5) eller för ämnen som binds kovalent till sedimentet, kan förtäring av förorenad föda vara en betydande exponeringsrutt. För att toxiciteten hos starkt lipofila ämnen inte ska underskattas kan tillsättning av föda till sedimentet före applicering av testämnet övervägas. För att alla potentiella exponeringsrutter ska beaktas har denna testmetod fokus på långvarig exponering. Testets längd är 20–28 dagar för C. *riparius* och C. *yoshimatsui* och 28–65 dagar för C. *tentans*. Om korttidsdata krävs för ett specifikt ändamål, t.ex. för att undersöka effekterna av en instabil kemikalie, kan tilläggsreplikat avlägsnas efter tio dagar.

4. De endpoints som mäts är det totala antalet kläckta vuxna exemplar och utvecklingstiden fram till kläckning. Det rekommenderas att mätningar av larvernas överlevnad och tillväxt endast görs efter en tiodagarsperiod i fall där ytterligare korttidsdata krävs, med användning av ytterligare replikat enligt vad som är lämpligt.

5. För detta test rekommenderas syntetiskt sediment. Syntetiskt sediment har flera fördelar jämfört med naturliga sediment:

   — Variationen mellan experiment reduceras eftersom syntetiskt sediment bildar en reproducerbar ”standardmatris”, och behovet av att få fram oförorenade och rena sediment elimineras.

   — Testningen kan inledas när som helst utan att beakta säsongvariationer i testsedimentet och det behövs ingen förbehandling av sediment för att få bort naturligt förekommande fauna. När syntetiskt sediment används uppstår heller inte kostnader för insamling på fältet av tillräckliga mängder sediment för rutintestning.

   — Användning av syntetiskt sediment ger möjlighet till jämförelser av toxicitet och därmed klassificering av ämnen.

6. Definitioner finns i tillägg 1.

▼M4

PRINCIP FÖR TESTMETODEN

7. Chironomidlarver i första larvstadiet exponeras för ett urval koncentrationer av testkemikalien i sediment-vattensystem. Testämnet spikas i sedimentet och därefter tillförs larverna i testkärlen som har stabiliserade sediment- och vattenkoncentrationer. Kläckning av fullbildade myggor och utvecklingshastighet mäts i slutet av testet. Överlevande larver och deras vikt kan också mätas efter tio dagar om så krävs (med användning av ytterligare replikat enligt det som är lämpligt). Dessa data analyseras med användning av en regressionsmodell för att uppskatta den koncentration som skulle orsaka × % minskning av antalet fullbildade myggor eller av larvernas överlevnad eller tillväxt (t.ex. EC_{15}, EC_{50} osv.) eller genom användning av statistisk hypotesprövning för att bestämma NOEC/LOEC. Hypotesprövningen kräver en jämförelse mellan effektvärden och kontrollvärden med användning av statistiska test.

INFORMATION OM TESTÄMNET

8. Testämnets vattenlöslighet, ångtryck, uppmätta eller beräknade fördelning i sedimentet samt stabilitet i vatten och sediment bör vara kända. Det bör finnas en tillförlitlig analysmetod för kvantifiering av testämnet i överliggande vatten, porvatten och sediment med känd och rapporterad exakthet och detektionsgräns. Det är också bra att känna till testämnets strukturformel och renhet. Hur testämnet agerar kemiskt (t.ex. upplösning, abiotisk och biotisk nedbrytning osv.) hör också till den information som är användbar. Närmare vägledning för testning av ämnen vars fysikalkemiska egenskaper försvårar detta test finns i (12).

REFERENSKEMIKALIER

9. Referenskemikalier kan testas periodiskt för att säkerställa att testprotokollet och testbetingelserna är tillförlitliga. Exempel på toxiska referensämnen som med framgång har använts i ringtest och valideringsstudier är lindan, trifluranid, pentaklorfenol, kadmiumklorid och kaliumklorid (1) (2) (5) (6) (13).

TESTETS GILTIGHET

10. För att testet ska vara giltigt gäller följande villkor:

— Kläckningen av vuxna exemplar i kontrollkärlen måste vara minst 70 % i slutet av testet (1) (6).

— Kläckningen av vuxna exemplar av *C. riparius* och *C. yoshimatsui* i kontrollkärlen bör inträffa 12–24 dagar efter att de har införts i kärlen, för *C. tentans* krävs en period på 20–65 dagar.

— Vid slutet av testet bör pH och koncentrationen upplöst syre mätas i varje kärl. Syrekoncentrationen bör vara minst 60 % av luftmättnadsvärdet (ASV) vid den använda temperaturen och pH i överliggande vatten bör vara 6–9 i alla testkärl.

— Variationen i vattentemperatur får inte vara större än ± 1,0 °C. Vattentemperaturen kan hållas under kontroll genom att göra testningen i ett isotermiskt utrymme, varvid rumstemperaturen bör kontrolleras med lämpliga tidsintervall.

▼M4

METODBESKRIVNING

Testkärl

11. Testet görs i 600 ml-glasbägare med 8 cm i diameter. Även andra slags kärl kan användas, men då måste det gå att garantera att överliggande vatten och sediment har lämpliga djup. Sedimentytan bör vara tillräckligt stor för att ge 2–3 cm^2 per larv. Förhållandet mellan sedimentskiktets djup och överliggande vattnets djup bör vara 1:4. Testkärl och annan apparatur som kommer i kontakt med testsystemet bör vara gjorda av glas eller annat kemiskt inert material (t.ex. teflon).

Val av arter

12. Den art som används i testet ska helst vara *Chironomus riparius*. *Chironomus tentans* kan också vara lämplig, men den är svårare att hantera och kräver en längre testperiod. Även *Chironomus yohimatsui* kan användas. I tillägg 2 finns närmare uppgifter om odlingsmetoder för *Chironomus riparius*. Information om odlingsbetingelser finns också för andra arter, t.ex. *Chironomus tentans* (4) och *Chironomus yoshimatsui* (11). Arternas identifiering måste bekräftas före testningen men är inte nödvändig före varje test om organismerna härrör från en odling inom laboratoriet.

Sediment

13. Helst ska syntetisk sediment användas. Om naturligt sediment används bör dess egenskaper bestämmas (minst pH, halten organiskt kol, och gärna även andra parametrar såsom förhållandet C/N och granulometri). Sedimentet måste även vara fritt från föroreningar och andra organismer som kan konkurrera med eller konsumera chironomiderna. Dessutom rekommenderas att naturligt sediment som är avsett att användas i ett chironomidtoxicitetstest konditioneras i sju dagar under samma betingelser som råder i det efterföljande testet. Följande syntetiska sediment, baserat på den syntetiska jord som används i testmetod C.8 (14), rekommenderas för detta test (1) (15) (16):

a) 4–5 % (torrvikt) torv så nära pH 5,5–6 som möjligt; det är viktigt att använda endast lufttorkad och finmalen torv i pulverform (partikelstorlek ≤ 1 mm).

b) 20 % (torrvikt) kaolinlera (kaolinithalt helst över 30 %).

c) 75–76 % (torrvikt) kvartssand (till största delen bestående av fin sand där mer än 50 % av partiklarna har storleken 50–200 μm).

d) Avjoniserat vatten tillsätt så att blandningen får en slutlig fukthalt på 30–50 %.

e) Kemiskt rent kalciumkarbonat $CaCO_3$) tillsätts för att justera den slutliga sedimentblandningens pH till 7,0 ± 0,5. Den slutliga blandningens kolhalt bör vara 2 % ± 0,5 % och kan justeras med hjälp av lämpliga mängder torv och sand, enligt punkterna a och c.

14. Torv, kaolinlera och sand ska härröra från kända källor. Sedimentkomponenterna bör kontrolleras för att bekräfta avsaknaden av kemiska föroreningar (t.ex. tungmetaller, organiska klorföreningar, organiska fosforföreningar osv.) Ett exempel på hur syntetiskt sediment kan tillredas beskrivs i tillägg 3. Det är också godtagbart att blanda torra beståndsdelar om det går att demonstrera att tillsats av överliggande vatten inte leder till att sedimentets beståndsdelar separerar (t.ex. flytande torvpartiklar) och att torven eller sedimentet konditioneras tillräckligt.

▼M4

Vatten

15. Allt vatten som uppfyller de kemiska kriterierna för godtagbart utspädningsvatten (se tilläggen 2 och 4) är lämpligt som testvatten. Allt lämpligt vatten, naturligt vatten (ytvatten eller grundvatten), rekonstituerat vatten (se tillägg 2) och avklorerat kranvatten är godtagbart som odlings- och testvatten om chironomiderna överlever i det under odling, acklimatisering och testning utan att uppvisa tecken på stress. Vid teststart ska testvattnets pH vara mellan 6 och 9 och totalhårdheten får inte vara högre än 400 mg/l uttryckt som $CaCO_3$. Om man misstänker växelverkan mellan hårdhetsjoner och testämnet, bör vatten med lägre hårdhet användas (i en sådan situation får Elendt Medium M4 inte användas). Samma typ av vatten bör användas under hela testningen. De vattenkvalitetsegenskaper som förtecknas i tillägg 4 bör mätas minst två gånger om året eller om man misstänker att egenskaperna har ändrats betydligt.

Stamlösningar – spikat sediment

16. Spikat sediment med vald koncentration bereds i regel genom tillsättning av en lösning av testämnet direkt i sedimentet. En stamlösning av testämnet upplöst i avjoniserat vatten blandas med det syntetiska sedimentet i en rullkvarn, matningsblandare eller manuellt. Om testämnet har låg löslighet i vatten kan det lösas upp i minsta möjliga volym lämpligt organiskt lösningsmedel (t.ex. hexan, aceton eller kloroform). Denna lösning blandas sedan med 10 g fin kvartssand för ett testkärl. Lösningsmedlet får avdunsta och måste vara helt avlägsnat ur sanden, och därefter blandas sanden med lämplig mängd sediment per testbägare. Endast ämnen som avdunstar lätt får användas för att upplösa, dispergera eller emulgera testämnet. Här bör noteras att den sand som följer med testämnet och sandblandningen måste beaktas när sedimentet förbereds (dvs. sedimentet ska ha mindre mängd sand). Det är viktigt att se till att testämnet som tillsätts sedimentet fördelas omsorgsfullt och jämnt inom sedimentet. Vid behov kan delprover analyseras för att bestämma homogeniteten.

TESTETS UTFORMNING

17. Testets utformning avser antalet koncentrationer och intervallen mellan dem, antalet kärl per koncentration och antalet larver per kärl. Här beskrivs utformningar för uppskattning av effektkoncentration, uppskattning av NOEC och för gränstest.

Utformning för regressionsanalys

18. Effektkoncentrationen (t.ex. EC_{15}, EC_{50}) och det koncentrationsområde som är relevant för testämnet bör omfattas av de koncentrationer som ingår i testet. Allmänt taget gäller att exaktheten och särskilt giltigheten för uppskattningar av effektkoncentrationer (EC_x) förbättras när effektkoncentrationen ligger inom området för de koncentrationer som testas. Extrapolering under lägsta positiva koncentration eller över högsta koncentration bör undvikas. Preliminära test kan användas för att hitta rätt koncentrationsområde (se punkt 27).

▼M4

19. Om EC_x ska uppskattas bör testet omfatta minst fem koncentrationer och tre replikat för varje koncentration. Det är under alla omständigheter tillrådligt att använda tillräckligt många testkoncentrationer för att få en god modelluppskattning. Faktorn mellan koncentrationer bör inte vara större än två (undantag kan göras i fall där dos-responskurvan har liten lutning). Antalet replikat per behandling kan minskas om antalet testkoncentrationer med olika respons ökas. En ökning av antalet replikat eller minskning av testkoncentrationsintervall tenderar att leda till ett smalare konfidensintervall för testet. Ytterligare replikat krävs om en uppskattning ska göras av larvernas överlevnad och tillväxt under en tiodagarsperiod.

Upplägg för uppskattning av NOEC/NOEC

20. Om LOEC eller NOEC ska uppskattas bör fem testkoncentrationer med minst fyra replikat användas och faktorn mellan koncentrationerna bör inte vara större än två. Antalet replikat bör vara tillräckligt för att säkerställa tillräcklig statistisk styrka för att upptäcka en skillnad på 20 % jämfört med kontrollen vid nivån 5 % för signifikans (p = 0,05). För uppskattning av utvecklingshastighet är det i regel lämpligt med variansanalys (ANOVA), såsom Dunnets eller Williams test (17) (18) (19) (20). För kläckningsfrekvens kan ett Cochran-Armitage-test, Fishers exakta test (med Bonferroni-korrigering) eller ett Mantel-Haenszel-test användas.

Gränstest

21. Gränstest kan göras (en testkoncentration och kontroll) om inga effekter framkommit vid det preliminära testet för att fastställa testområde. Syftet med gränstest är att genomföra ett test vid en koncentration som är tillräckligt hög för att man ska kunna utesluta eventuella toxiska effekter av testämnet, och gränsen sätts vid en koncentration som inte förväntas förekomma i någon situation. 1 000 mg/kg (torrvikt) rekommenderas. I regel krävs minst sex replikat både för behandling och kontroll. Man måste kunna demonstrera tillräcklig statistisk styrka för att upptäcka en skillnad på 20 % jämfört med kontrollen vid nivån 5 % för signifikans (p = 0,05). Eftersom t-test ger kvantitativ respons (utvecklingshastighet och vikt) är t-test en lämplig statistisk metod förutsatt att data uppfyller testkraven (normalitet, homogena varianser osv.). Om dessa krav inte uppfylls kan man använda t-testet med olika varians eller ett icke-parametriskt test, såsom Wilcoxon-Mann-Whitneys test. För kläckningsfrekvens är det lämpligt att använda Fischers exakta test.

FÖRFARANDE

Exponeringsbetingelser

Beredning av systemet med spikat sediment och vatten

22. Det förfarande för spikning som beskrivs i testmetod C.8 (Toxicitet för daggmaskar) rekommenderas för applicering av testämnet (14). Spikade sediment placeras i kärlen och överliggande vatten tillsätts så att förhållandet mellan sediment och vatten är 1:4 (se punkterna 11 och 15). Sedimentets djup bör vara 1,5–3 cm. För att undvika separation av sedimentets beståndsdelar och återsuspension av finfördelat material medan testvatten tillsätts i vattenkolumnen, kan sedimentet täckas med en plastplatta medan vattnet tillsätts, varefter plattan avlägsnas omedelbart. Även andra metoder kan vara lämpliga.

23. Testkärlen bör vara täckta (t.ex. med glasplattor). Vid behov fylls under testets gång vatten på till ursprunglig volym för att kompensera för avdunstning. Detta bör göras med destillerat eller avjoniserat vatten för att förebygga ackumulering av salter.

▼M4

Stabilisering

24. Efter beredning av spikat sediment och överliggande vatten rekommenderas att testämnet får fördelas från vattenfasen till sediment (3) (4) (6) (13). Detta bör helst göras med samma temperatur- och luftningsbetingelser som används vid testningen. Stabiliseringstiden beror på sedimentet och kemikalien, och kan variera mellan några timmar och flera dagar, i sällsynta fall upp till flera veckor (4–5 veckor). Eftersom en lång stabiliseringstid kan leda till att vissa kemikalier sönderfaller, eftersträvas här inte jämvikt; i stället rekommenderas en stabiliseringstid på 48 timmar. I slutet av denna jämviktsperiod ska testämnets koncentration mätas i det överliggande vattnet, porvattnet och sediment, åtminstone för den högsta koncentrationen och en lägre koncentration (se punkt 38). Dessa analytiska bestämningar av testämnet gör det möjligt att beräkna massbalans och uttrycka resultaten på grundval av uppmätta koncentrationer.

Tillförsel av testorganismer

25. Fyra till fem dagar innan testorganismerna tillförs testkärlen ska äggmassorna avlägsnas från odlingarna och placeras i små kärl i odlingsmedium. Åldrat medium från stamodling eller färskt berett medium kan användas. Om färskt medium används bör en liten mängd föda, t.ex. grönalger och/eller några droppar filtrat från en finmald suspension av fiskfoder i flingform tillsättas odlingsmediet (se tillägg 2). Endast färska äggmassor får användas. I regel börjar larverna kläckas några dagar efter att äggen har lagts (2–3 dagar för *Chironomus riparius* vid 20 °C och 1–4 dagar för *Chironomus tentans* vid 23 °C och *Chironomus yoshimatsui* vid 25 °C), och larvernas tillväxt sker i fyra stadier på 4–8 dagar per stadium. För testet ska första stadiets larver användas (2–3 eller 1–4 dagar efter kläckningen). Bestämning av larvstadium kan möjligen göras genom mätning av huvudkapseldiameter (6).

26. Tjugo första stadiets larver fördelas slumpvis till varje testkärl som innehåller spikat sediment och vatten, med användning av en trubbig pipett. Luftningen av vattnet måste stoppas medan larverna tillsätts testkärlen och hållas stoppad i ytterligare 24 timmar efter tillsättningen (se punkterna 25 och 32). Enligt det testupplägg som används (se punkterna 19 och 20) är antalet larver per testkoncentration minst 60 för uppskattning av EC-punkt och 80 för bestämning av NOEC.

Testkoncentrationer

27. Ett preliminärt test kan användas för att fastställa koncentrationerna för det definitiva testet. För detta ändamål används en serie brett spridda koncentrationer av testämnet. För att få samma ytdensitet per chironomid som ska användas för det slutliga testet, exponeras chironomiderna för varje koncentration av testämnet under en period som ger möjlighet att uppskatta lämpliga testkoncentrationer. Inga replikat krävs.

28. Testkoncentrationerna för det definitiva testet baseras på resultaten från det preliminära testet. Det ska finnas minst fem testkoncentrationer som väljs enligt beskrivningen i punkterna 18–20.

▼M4

Kontrollkärl

29. Kontrollkärl som inte innehåller testämne utan enbart sediment bör ingå i testet med lämpligt antal replikat (se punkterna 19 och 20). Om lösningsmedel har använts för applicering av testämnet (se punkt 16) bör det också finnas kontrollkärl med sediment och lösningsmedel.

Testsystem

30. De system som används är statiska. Semistatiska system eller genomflödessystem med intermittent eller kontinuerlig förnyelse av överliggande vatten kan användas i undantagsfall, t.ex. om vattenkvalitetspecifikationerna inte är lämpliga för testorganismen eller påverkar den kemiska jämvikten (t.ex. om syrenivåerna blir för låga, koncentrationen av utsöndrade produkter blir för hög eller om mineraler släpps ut från sedimentet och påverkar pH och/eller vattenhårdheten). I regel är det dock tillräckligt och rekommendabelt att använda andra metoder för kompensering av kvaliteten på överliggande vatten, såsom luftning.

Foder

31. Larverna bör ges foder helst dagligen eller minst tre gånger per vecka. Fiskfoder (suspension i vatten eller finmalt foder, t.ex. Tetra-Min eller Tetra-Phyll, se närmare i tillägg 2) i mängder om 0,25–0,5 mg (0,35–0,5 mg för C. *yoshimatsui*) per larv per dag anses vara lämpligt för unga larver under de tio första dagarna. För äldre larver kan det krävas lite större mängd: 0,5–1 mg per larv och dag bör vara tillräckligt för återstoden av testet. Mängden bör minskas för alla behandlingar och kontroller om det uppstår svamptillväxt eller mortalitet observeras i kontrollerna. Om svamptillväxten inte kan stoppas måste testet upprepas. Vid testning av starkt adsorberande ämnen (t.ex. log K_{ow} > 5) eller ämnen som är kovalent bundna till sedimentet, kan mängden foder som krävs för att säkerställa överlevnad och naturlig tillväxt för organismerna tillsättas i det syntetiska sedimentet före stabiliseringsperioden. Då ska växtmaterial användas i stället för fiskfoder, t.ex. 0,5 % (torrvikt) finmalda löv från t.ex. brännässla (*Urtica dioica*), mullbär (*Morus alba*), vitklöver (*Trifolium repens*), spenat (*Spinacia oleracea*) eller annat växtmaterial (*Cerophyl* eller alfacellulosa).

Inkubationsbetingelser

32. Skonsam luftning av överliggande vatten i testkärlen införs helst 24 timmar efter tillsättning av larverna och får pågå genom hela testet (se till att halten upplöst syre inte faller under 60 % av luftmättnadsvärdet ASV). Luftningen görs med hjälp av en Pasteur-glaspipett som är fäst 2–3 cm ovanför sedimentskiktet (en eller ett fåtal bubblor per sekund). Vid testning av flyktiga kemikalier kan man överväga att utesluta luftning av sediment-vattensystemet.

33. Testet genomförs vid konstant temperatur på 20 °C (± 2 °C). För C. *tentans* och C. *yoshimatsui* rekommenderas temperaturer på 23 °C respektive 25 °C (± 2 °C). En ljusperiod på 16 timmar används och ljusintensiteten ska vara 500–1 000 lux.

▼M4

Exponeringstid

34. Exponeringen inleds när larver tillsätts i spikade kärl och kontrollkärl. Den maximala exponeringstiden är 28 dagar för C. *riparius* och C. *yoshimatsui* och 65 dagar för C. *tentans*. Om myggor kläcks tidigare, kan testet avslutas efter minst fem dagar efter att det sista vuxna exemplaret har kläckts i kontrollen.

Observationer

Kläckning

35. Utvecklingstiden och totalantalet fullbildade han- och honmyggor bestäms. Hanarna är lätta att känna igen på sina fjäderantenner.

36. Testkärlen bör granskas visuellt minst tre gånger i veckan för att bedöma förekomsten av onormalt beteende (t.ex. exemplar som lämnar sedimentet, ovanligt simmande) jämfört med kontrollen. Under perioden för förväntad kläckning är det nödvändigt att dagligen räkna antalet kläckta exemplar. Kön och antal fullbildade exemplar registreras dagligen. Efter identifiering avlägsnas myggorna från kärlen. Ägg som har deponerats före testets slutförande bör registreras och därefter avlägsnas för att förhindra att larver på nytt introduceras i sedimentet. Likaså ska registrering göras av antalet synliga puppor som inte har kläckts. Vägledning om övervakning av kläckning finns i tillägg 5.

Tillväxt och överlevnad

37. Om det krävs data om överlevnad och tillväxt under en tiodagarsperiod bör ytterligare testkärl införlivas från början, så att dessa därefter kan användas. Larverna i sedimentet från dessa tilläggskärl tillvaratas genom sållning med ett 250 μm-såll. Kriterierna för död är orörlighet eller utebliven reaktion på mekanisk stimulans. Larver som inte tillvaratas bör räknas som döda (larver som har dött i början av testet kan ha sönderdelats av mikrober). Torrvikten (askfri) för överlevande larver per testkärl bestäms och den genomsnittliga individuella torrvikten per kärl beräknas. Det är bra att bestämma vilket stadium överlevande larver tillhör, och för detta kan mätning av huvudkapselns bredd användas.

Analytiska mätningar

Testämnets koncentration

38. Innan testet inleds, dvs. före tillsättning av larver, tas prover av bulksediment från minst ett kärl per behandling för analytisk bestämning av testämnets koncentration i sedimentet. Man bör åtminstone analysera prover av överliggande vatten, porvatten och sediment i början (se punkt 24) och i slutet av testet, för den högsta koncentrationen och en lägre koncentration. Dessa bestämningar av testämneskoncentrationen ger information om testämnets beteende/fördelning i vatten-sedimentsystemet.

39. Om mellanliggande mätningar görs (t.ex. dag 7) och om det för analysen krävs stora prover som inte kan tas från testkärlen utan att testsystemet påverkas, bör de analytiska bestämningarna göras på prover som tas från extra testkärl som behandlas på samma sätt (inklusive förekomst av testorganismer) men som inte används för biologiska observationer.

▼M4

40. Centrifugering vid t.ex. 10 000 g och 4 °C i 30 minuter är det rekommenderade förfarandet för att isolera porvatten. Om det har demonstrerats att testämnet inte adsorberas på filter kan även filtrering godtas. I vissa fall är det kanske inte möjligt att analysera koncentrationerna i porvattnet därför att provet är för litet.

Fysikalkemiska parametrar

41. Testkärlens pH och temperatur bör mätas på lämpligt sätt (se punkt 10). Hårdhet och ammonium bör mätas i kontrollerna och ett testkärl vid den högsta koncentrationen i början och slutet av testet.

DATA OCH RAPPORTERING

Behandling av resultaten

42. Syftet med detta test är att bestämma testämnets effekt på utvecklingshastigheten och totalantalet fullbildade han- och honmyggor eller, om det gäller ett tiodagarstest, effekterna på larvernas överlevnad och vikt. Om det inte finns indikationer på statistiskt avvikande känslighet för hanar och honor, kan resultaten poolas för statistiska analyser. Känslighetsskillnaderna mellan hanar och honor kan bedömas statistiskt, t.ex. genom ett ”χ^2-r × 2 table test”. Larvernas överlevnad och genomsnittlig individuell torrvikt per kärl måste bestämmas efter tio dagar där detta krävs.

43. Effektkoncentrationerna uttryckta och baserade på torrvikt beräknas helst på grundval av uppmätta sedimentkoncentrationer vid testets början (se punkt 38).

44. För att beräkna en punktvis uppskattning av EC_{50} eller något annat EC_x-värde, kan statistiken per kärl användas som äkta replikat. Vid beräkning av konfidensintervallet för ett EC_x-värde bör variansen mellan kärl beaktas, eller så bör man påvisa att variansen är så liten att den kan ignoreras. Om modellen anpassas med minsta kvadratmetoden bör transformation tillämpas på den kärlvisa statistiken i syfte att förbättra variansens homogenitet. EC_x-värdena bör dock beräknas när responsen har transformerats tillbaka till det ursprungliga värdet.

45. När syftet med den statistiska analysen är att bestämma NOEC/LOEC genom hypotestestning, måste variansen mellan kärl beaktas, t.ex. genom nästad ANOVA. Alternativt kan mer robust testning (21) vara lämplig i situationer där de vanliga ANOVA-antagandena inte gäller.

Kläckningsfrekvens

46. Kläckningsfrekvenser är dikotoma (tvåpunktsfördelade) data och kan analyseras genom Cochran-Armitage test som tillämpas på step-down-grund där monoton dos-respons förväntas och dessa data stämmer överens med förväntningen. Om inte, kan Fishers exakta test eller ett Mantel-Haenszel-test med Bonferroni-Holm-korrigerade p-värden användas. Om det finns bevis på större variation mellan replikat inom samma koncentration än det som en binomial fördelning skulle indikera (ofta kallad extra-binomial fördelning), bör ett robust Cochran-Armitage-test eller Fischers exakta test användas, enligt det som föreslås i punkt 21.

▼M4

Det totala antalet myggor som kläckts per kärl, n_e, bestäms och divideras med antalet tillsatta larver, n_a enligt följande:

$$ER = \frac{n_e}{n_a}$$

där:

ER = kläckningsfrekvens

n_e = antalet myggor som kläckts per kärl

n_a = antalet larver som tillsatts per kärl

47. Ett alternativ som bäst lämpar sig för stora provstorlekar, när det finns extrabinomial varians, är att behandla kläckningsfrekvensen som en kontinuerlig respons och använda förfaranden såsom William-test när monoton dos-respons förväntas och stämmer överens med dessa data för kläckningsfrekvens. Dunnett-test är lämpligt i fall där det inte är hållbart med monotonicitet. I detta sammanhang definieras begreppet ”stort prov” som ett prov där antalet kläckta och antalet inte kläckta överstiger fem, per replikatkärl.

48. Vid användning av ANOVA-metoder bör värdena för kläckningsfrekvens först transformeras genom arcsin-sqrt-transformation eller Freeman-Tukey-transformation för att få en ungefärlig normalfördelning och jämna ut varianserna. Cochran-Armitage-test, Fishers exakta test (Bonferroni) eller Mantel-Haenszel-test kan användas när absoluta frekvenser används. För att göra arcsin-sqrt-transformation tar man inverterad sinus ($\sin^{-1}$) av kvadratroten av kläckningsfrekvensen.

49. EC_x-värden för kläckningsfrekvenser beräknas med regressionsanalys (t.ex. probit (22), logit, Weibull, lämplig kommersiell mjukvara eller dylikt). Om regressionsanalysen inte lyckas (om det t.ex. finns mindre än två partiella responser) används andra icke-parametriska metoder såsom glidande medelvärde eller enkel interpolering.

Utvecklingshastighet

50. Med genomsnittlig utvecklingstid avses den genomsnittliga tidsomfattningen mellan tillsättning av larver (testdag 0) och kläckningen av den experimentella kohorten myggor (för beräkning av den faktiska utvecklingstiden bör man beakta larvernas ålder vid tillsättningstidpunkten). Värdet för utvecklingshastighet är det reciproka värdet av tidsenheten för utveckling (enhet: 1/dag) och representerar den andel larvutveckling som sker per dag. Utvecklingshastigheten är det mått som helst ska användas för utvärdering av dessa sedimenttoxicitetsstudier eftersom variansen är lägre och homogenare samt närmare normalfördelningen i jämförelse med utvecklingstiden. Kraftfulla parametriska testförfaranden kan alltså användas baserade på utvecklingshastighet hellre än på utvecklingstid. För utvecklingshastighet som en kontinuerlig respons kan EC_x-värden uppskattas med hjälp av regressionsanalys (t.ex. (23), (24)).

51. För efterföljande statistiska test antas antalet myggor observerade på inspektionsdag × ha kläckts i mitten av tidsintervallet mellan dag × och dag x-1 (l är inspektionsintervallets längd, i regel 1 dag). Genomsnittlig utvecklingshastighet per kärl (x) beräknas enligt följande:

$$\overline{x} = \sum_{i=1}^{m} \frac{f_i x_i}{n_e}$$

▼M4

där:

$\bar{x}$: genomsnittlig utvecklingshastighet per kärl

i: index för inspektionsintervall

m: maximiantalet inspektionsintervall

f_i: antalet myggor som kläckts under inspektionsintervallet i

n_e: totalantalet myggor som kläckts i slutet av experimentet ($= \sum f_i$)

x_i: utvecklingshastigheten för myggor som kläckts under intervallet i

$$x_i = \frac{1}{\left(day_i - \frac{l_i}{2}\right)}$$

där:

dag_i: inspektionsdag (dagar från appliceringen)

l_i: inspektionsintervallets längd i (dagar, i regel 1 dag)

Testrapport

52. Testrapporten ska innehålla minst följande uppgifter:

Testämne:

— Fysikalisk natur och, där det är relevant, fysikalkemiska egenskaper (vattenlöslighet, ångtryck, fördelningskoefficient i jord (eller i sediment, om tillgänglig), stabilitet i vatten osv.).

— Kemiska identifieringsdata (trivialnamn, kemiskt namn, strukturformel, CAS-nummer osv.) samt renhet och analysmetod för kvantifiering av testämnet.

Testarter:

— Organismer som använts för testet: art, vetenskapligt namn, ursprung och odlingsbetingelser.

— Information om hantering av äggmassor och larver.

— Organismernas ålder när de tillförs testkärlen.

Testbetingelser:

— Sediment som använts (naturligt eller syntetiskt).

— För naturligt sediment, insamlingsplatsens belägenhet och beskrivning av sedimentet, inbegripet i mån av möjlighet föroreningshistoria och egenskaper: pH, halten organiskt kol, C/N-kvot och granulometri (om lämpligt).

— Beredning av syntetiskt sediment: beståndsdelar och egenskaper (halten organiskt kol, pH, fukthalt osv. vid testets början).

— Beredning av testvatten (om rekonstituerat vatten används) och egenskaper (syrehalt, pH, konduktivitet, hårdhet osv. vid testets början).

— Sedimentets och överliggande vattnets djup.

— Volymen för överliggande vatten och porvatten, vikten för vått sediment med och utan porvatten.

▼M4

— Testkärl (material och storlek).

— Metod för spikning av sediment: testkoncentrationer, antalet replikat och, i förekommande fall, använt lösningsmedel.

— Fasen för stabilisering av jämvikt i systemet med spikat sediment och vatten: varaktighet och betingelser.

— Inkubationsbetingelser: temperatur, ljuscykel och intensitet samt luftning (frekvens och intensitet).

— Detaljerad information om utfodringen, inklusive typ av foder, beredning, mängd och utfodringsschema.

Resultat:

— Nominella testkoncentrationer, uppmätta testkoncentrationer och resultaten av alla analyser för bestämning av testämnets koncentration i testkärl.

— Vattenkvaliteten i testkärlen – pH, temperatur, upplöst syre, hårdhet och ammonium.

— Ersättning av avdunstat testvatten, i förekommande fall.

— Antalet kläckta hon- och hanmyggor per kärl och dag.

— Antalet larver som inte utvecklats till myggor, per kärl.

— Genomsnittlig individuell torrvikt för larver per kärl och per stadium, om lämpligt.

— Procentandel kläckta exemplar per replikat- och testkoncentration (han- och honmyggor poolade).

— Genomsnittlig utvecklingshastighet för fullbildade myggor per replikat och behandlingsnivå (han- och honmyggor poolade).

— Uppskattning av toxiska endpoints t.ex. EC_x (och associerade konfidensintervall), NOEC och/eller LOEC och de statistiska metoder som använts för bestämning av dem.

— Diskussion av resultaten, inbegripet inverkan på testresultatet som kan tillskrivas avvikelser från denna testmetod.

LITTERATUR

(1) BBA (1995), ”Long-term toxicity test with Chironomus riparius: Development and validation of a new test system”, redigerat av M. Streloke och H.Köpp. Berlin 1995.

(2) Fleming R. m.fl. 1994), ”Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances”, Slutlig rapport till Europeiska kommissionen, rapport nr EC 3738, augusti 1994, WRc, UK.

(3) SETAC (1993), ”Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments”, WOSTA Workshop, Nederländerna.

(4) ASTM International/E1706-00 (2002), ”Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates”, s. 1125–1241, *ASTM International 2002 Annual Book of Standards*, vol. 11.05, ”Biological Effects and Environmental Fate;Biotechnology; Pesticides”, ASTM International, West Conshohocken, PA.

(5) Environment Kanada (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”, andra utgåvan, *EPA 600/R-99/064*, mars 2000, revidering av första utgåvan juni 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 K. E., McLeay D. J. och Kirby R. S. (1996), ”Recent intra- and inter-laboratory studies related to the development and standardisation of Environment Kanada’s biological test methods for measuring sediment toxicity using freshwater amphipods *(Hyalella azteca)* and midge larvae *(Chironomus riparius)*” Technical Report, Environment Kanada, National Water Research Institute, Burlington, Ontario, Kanada.

(10) Sugaya Y. (1997), ”Intra-specific variations of the susceptibility of insecticides *in Chironomus yoshimatsui*”, *Jp. J. Sanit. Zool.* 48 (4), s. 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), s. 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*, Nr 23.

(13) Environment Kanada (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) Testmetod C.8 i denna bilaga, Toxicitet hos daggmaskar.

(15) Suedel B. C. och Rodgers J. H. (1994), ”Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing”, *Environ. Toxicol. Chem.* 13, s. 1163–1175.

(16) Naylor C. och Rodrigues C., (1995), ”Development of a test method for Chironomus riparius using a formulated sediment”, *Chemosphere* 31, s. 3291–3303.

(17) Dunnett C. W. (1964), ”A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control”, *J. Amer. Statis. Assoc.*, 50, s. 1096–1121.

(18) Dunnett C. W. (1964), ”New tables for multiple comparisons with a control”, *Biometrics*, 20, s. 482–491.

(19) Williams D. A. (1971), ”A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control”, *Biometrics*, 27, s. 103–117.

(20) Williams D. A. (1972), ”The comparison of several dose levels with a zero dose control”, *Biometrics*, 28, s. 510–531.

(21) Rao J. N. K. och Scott A. J. (1992), ”A simple method for the analysis of clustered binary data”, *Biometrics*, 48, s. 577–585.

(22) Christensen E. R. (1984), ”Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model”, *Water Research* 18, s. 213–221.

(23) Bruce och Versteeg (1992), ”A statistical procedure for modelling continuous toxicity data”, *Environmental Toxicology and Chemistry* 11, s. 1485–1494.

(24) Slob W. (2002), ”Dose-response modelling of continuous endpoints”, *Toxicol. Sci.* 66, s. 298–312.

▼**M4**

Tillägg 1

DEFINITIONER

I denna testmetod gäller följande definitioner:

syntetiskt sediment: rekonstituerat, konstgjort sediment som är en blandning av material avsedda att efterlikna de fysiska beståndsdelarna i naturligt sediment.

överliggande vatten: det vatten som hålls ovanför sedimentet i testkärlet.

porvatten: det vatten som finns i mellanrummen mellan sediment- och jordpartiklar.

spikat sediment: sediment med tillsatt testämne.

testkemikalie: alla ämnen eller blandningar som testas med denna testmetod.

▼M4

Tillägg 2

Rekommendationer för odling av *Chironomus riparius*

1. *Chironomus*-larver kan odlas i kristalliseringskärl eller stora behållare. Fin kvartssand sprids som ett tunt skikt på cirka 5–10 mm på behållarens botten. Även kiselgur (t.ex. Merck, Art. 8117) har visat sig vara ett lämpligt substrat (det räcker med ett tunt lager på några mm). Lämpligt vatten tillsätts till ett djup på flera cm. Vattennivåerna bör fyllas på efter behov för att ersätta avdunstning och förebygga uttorkning. Vattnet kan vid behov ersättas. Det bör finnas en skonsam luftning. De kärl som innehåller larver bör hållas i en lämplig bur som hindrar vuxna exemplar från att rymma. Buren bör vara tillräckligt stor för att de vuxna exemplaren ska kunna svärma, annars kan kopulation utebli (minimum är cirka 30 × 30 × 30 cm).

2. Burarna ska hållas i rumstemperatur eller ett tempererat utrymme vid 20 ± 2 °C med en ljusperiod på 16 timmar (intensitet ca 1 000 lux) och 8 timmar mörker. Det har rapporterats att luftfuktighet under 60 % RH kan hämma reproduktion.

Utspädningsvatten

3. Allt lämpligt naturligt eller syntetiskt vatten kan användas. Ofta används källvatten, avklorerat kranvatten och artificiella medier (t.ex. Elendt M4 eller M7, se nedan). Vattnet måste luftas före användningen. Vid behov kan odlingsvattnet förnyas genom att försiktigt hälla eller sifonera använt vatten från odlingskärlen utan att förstöra larvrören.

Utfodring av larver

4. *Chironomus*-larverna ges fiskfoder i flingform (Tetra Min®, Tetra Phyll® eller motsvarande patenterat märke), cirka 250 mg per kärl och dag. Fodret kan ges i form av torrt malet pulver eller som suspension i vatten: 1,0 g flingfoder blandas med 20 ml utspädningsvatten till en homogen blandning. Beredningen kan ges med en dosering på cirka 5 ml per kärl och dag (skaka om före användning). Äldre larver kan få en större dos.

5. Utfodringen justeras enligt vattenkvaliteten. Om odlingsmediet blir grumligt bör dosen sänkas. Foderdoseringen måste övervakas noggrant. För liten mängd leder till att larverna emigrerar mot vattenkolumnen och för stor mängd leder till ökad mikrobiell aktivitet och lägre syrekoncentrationer. Båda omständigheterna kan leda till minskad tillväxt.

6. Även celler av vissa grönalger (t.ex. *Scenedesmus subspicatus*, *Chlorella vulgaris*) kan tillsättas när nya odlingskärl läggs upp.

Utfodring av vuxna exemplar

7. Vissa testutövare har föreslagit att bomullskompresser indränkta i mättad sukroslösning kan användas som foder för vuxna exemplar.

▼M4

Kläckning

8. Vid 20 ± 2 °C börjar vuxna exemplar kläckas i odlingskärlen efter cirka 13–15 dagar. Hanarna är lätta att känna igen på sina fjäderantenner.

Äggmassor

9. När vuxna exemplar finns i odlingsburen bör alla larver i odlingskärlen kontrolleras tre gånger per vecka för att se om gelatinösa äggmassor har deponerats. Om sådana upptäcks, bör de avlägsnas försiktigt. Äggmassorna överförs till ett litet kärl som innehåller ett prov av odlingsvattnet. De används sedan för att starta nya odlingskärl (t.ex. 2–4 äggmassor per kärl) eller för toxicitetstest.

10. Första stadiets larver bör kläckas efter 2–3 dagar.

Uppläggning av nya odlingskärl

11. När odlingarna är etablerade bör det vara möjligt att lägga upp en färsk larvodling veckovis eller med längre intervall beroende på testningskraven, och avlägsna äldre kärl efter att vuxna myggor har kläckts. På detta sätt fås regelbunden tillgång till vuxna exemplar med minimal insats.

Beredning av testlösningarna M4 och M7

12. M4-mediet upptäcktes av Elendt (1990). M7-mediet bereds på samma sätt som M4-mediet med undantag för de ämnen som anges i tabell 1, för vilka koncentrationerna är fyra gånger lägre i M7 jämfört med M4. En publikation om M7-mediet är under arbete (Elendt, personlig kommunikation). Testlösningen ska inte beredas enligt Elendt och Bias (1990) eftersom de angivna koncentrationerna av $NaSiO_3 \cdot 5H_2O$, $NaNO_3$, KH_2PO_4 och K_2HPO_4 inte är lämpliga.

Beredning av M7-medium

13. Varje stamlösning (I) bereds individuellt och en kombinerad stamlösning (II) bereds av dessa stamlösningar (I) (se tabell 1). 50 ml av den kombinerade stamlösningen (II) och de mängder av varje stamlösning med makronäring som anges i tabell 2 och avjoniserat vatten tillsätts upp till 1 liter för att bereda M7-mediet. En stamlösning med vitaminer bereds genom att tillsätta tre vitaminer till avjoniserat vatten enligt tabell 3, och 0,1 ml av den kombinerade vitaminstamlösningen tillsätts till det slutliga M7-mediet strax före användningen (vitaminstamlösningen förvaras djupfryst i små alikvoter). Mediet luftas och stabiliseras.

LITTERATUR

BBA (1995), ”Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system”, redigerat av M. Streloke och H. Köpp. Berlin 1995.

▼**M4**

Tabell 1

Stamlösningar av spårelement för M4- och M7-medium

Stamlösningar (I)	Mängd (mg) som byggs upp till 1 liter med avjoniserat vatten	Beredning av kombinerad stamlösning (II): blanda följande mängder (ml) stamlösning (I) och bygg upp till 1 liter med avjoniserat vatten		Slutliga koncentrationer i testlösningarna (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
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
$CaCl_2 \cdot 2H_6O$	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) Dessa ämnen avviker i M4 och M7, såsom anges ovan.
(2) Dessa ämnen bereds individuellt, blandas och autoklaveras omedelbart.

Tabell 2

Stamlösningar med makronäringsämnen för medium M4 och M7

	Mängd som byggs upp till 1 liter med avjoniserat vatten (mg)	Mängd stamlösning med makronäringsämnen som tillsätts för att bereda medium M4 och M7 (ml/l)	Slutliga koncentrationer i testlösningarna M4 och 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

▼**M4**

Tabell 3

Stamlösningar med vitaminer för medium M4 och M7 Alla tre vitaminlösningar kombineras till en enda vitaminstamlösning.

	Mängd som byggs upp till 1 liter med avjoniserat vatten (mg)	Mängd stamlösning med vitaminer som tillsätts för att bereda medium M4 och M7 (ml/l)	Slutliga koncentrationer i testlösningarna M4 och M7 (mg/l)
Tiaminhydroklorid	750	0,1	0,075
Cyanokobalamin (B12)	10	0,1	0,0010
Biotin	7,5	0,1	0,00075

LITTERATUR

Elendt, B. P. (1990), ”Selenium Deficiency in Crustacean”, *Protoplasma* 154, s. 25–33.

Elendt, B. P. och 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), s. 1157–1167.

▼M4

Tillägg 3

BEREDNING AV SYNTETISKT SEDIMENT

Sedimentsammansättning

Syntetiskt sediment ska ha följande sammansättning:

Beståndsdel	Egenskaper	% av sedimentets torrvikt
Torv	Sphagnum, så nära pH 5,5–6 som möjligt utan synliga växtrester och finfördelad (partikelstorlek ≤1 mm) och lufttorkad.	4–5
Kvartssand	Partikelstorlek: > 50 % av partiklarna bör ha storlek inom området 50–200 μm	75–76
Kaolinitlera	Kaolinithalt ≥ 30 %	20
Organiskt kol	Justeras genom tillsats av torv och sand	2 (± 0,5)
Kalciumkarbonat	$CaCO_3$, pulveriserat, kemiskt rent	0,05–0,1
Vatten	Konduktivitet ≤ 10 μS/m	30–50

Beredning

Torven lufttorkas och mals ner till ett fint pulver. En suspension av behövlig mängd torvpulver i avjoniserat vatten bereds med effektiv homogeniseringsapparat. Suspensionens pH justeras till 5,5 ± 0,5 med $CaCO_3$. Suspensionen konditioneras minst två dagar med skonsam omrörning vid 20 ± 2 °C, för att stabilisera pH och etablera en stabil mikrobiell komponent, varefter pH uppmäts på nytt och bör vara 6,0 ± 0,5. Torvsuspensionen blandas sedan med de övriga beståndsdelarna (sand och kaolinlera) och avjoniserat vatten till ett homogent sediment med en vattenhalt som ger kring 30–50 procent torrvikt av sediment. Därefter mäts den slutliga blandningens pH på nytt och justeras vid behov till 6,5–7,5 med $CaCO_3$. Prover tas av sedimentet för att bestämma torrvikten och halten organiskt kol. Likaså rekommenderas att det syntetiska sediment som ska användas i ett chironomidtoxicitetstest konditioneras före användningen i sju dagar i samma betingelser som råder i det efterföljande testet.

Förvaring

De torra beståndsdelarna för beredning av syntetiskt sediment kan lagras i ett torrt och svalt utrymme vid rumstemperatur. Berett (vått) sediment ska inte lagras för användning i test. Det bör användas omedelbart efter den 7 dagar långa konditioneringsperioden i slutet av beredningen.

LITTERATUR

Kapitel C.8 i denna bilaga, Toxicitet hos daggmaskar.

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, s. 10–20.

▼M4

Tillägg 4

Krav på kemiska egenskaper hos utspädningsvatten

Ämne	Koncentrationer
Partikelinnehåll	< 20 mg/l
Totalt organiskt kol	< 2 mg/l
Ojoniserad ammoniak	< 1 µg/l
Hårdhet som $CaCO_3$	< 400 mg/l (*)
Restklor	< 10 µg/l
Bekämpningsmedel med organiska fosforföreningar, totalt.	< 50 ng/l
Bekämpningsmedel med organiska klorföreningar plus polyklorerade bifenyler, totalt.	< 50 ng/l
Totalt organiskt klor	< 25 ng/l

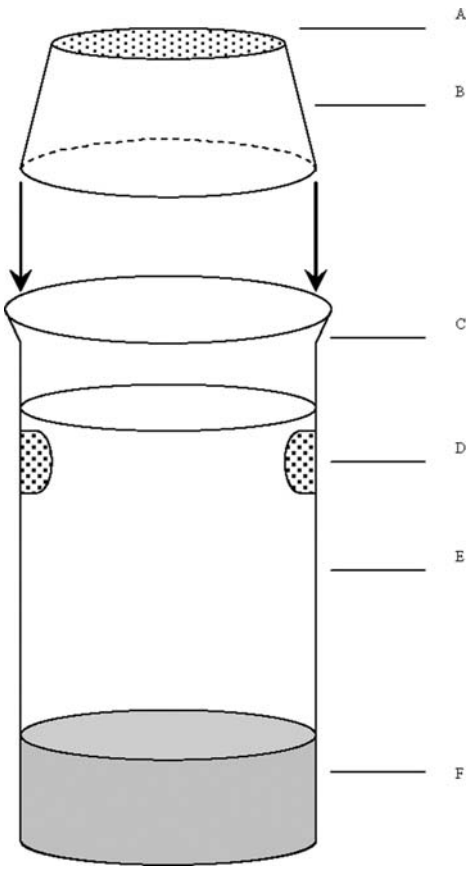
(*) Här bör noteras att om man misstänker växelverkan mellan hårdhetsjoner och testämnet, bör vatten med lägre hårdhet användas (och i en sådan situation får Elendt Medium M4 inte användas).

▼M4

Tillägg 5

Vägledning för övervakning av kläckning av chironomider

Fällor placeras på testbägarna. Dessa fällor behövs från dag 20 fram till testets slut. Exempel på en fälla visas nedan.



A: nylonnät

B: upp-och-nedvänd plastkopp

C: exponeringskärl utan läpp

D: filterportar för vattenutbyte

E: vatten

F: sediment

▼M4

C. 28 TOXICITETSTEST I SEDIMENT- OCH VATTENFAS PÅ CHIRONOMID-LARVER MED SPIKAT VATTEN

INLEDNING

1. Denna testmetod motsvarar OECD:s testriktlinje 219 (2004). Syftet med testmetoden är att bedöma effekterna av långvarig kemikalieexponering på sedimentlevande larver i sötvatten av fjädermyggor *Chironomus* sp. Den baserar sig i huvudsak på BBA-vägledningen med ett sediment-vatten-testsystem med syntetisk jord och vattenkolumnexponering (1). Metoden beaktar också existerande toxicitetstestprotokoll för *Chironomus riparius* och *Chironomus tentans* som har tagits fram i Europa och Förenta staterna (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) och ringtestats (1) (6) (9). Även övriga väldokumenterade chironomider kan användas, t.ex. *Chironomus yoshimatsui* (10) (11).

2. Exponeringen i denna testmetod görs med spikat vatten. Valet av lämpligt exponeringsscenario beror på den avsedda tillämpningen för testet. Vattenexponeringen med spikad vattenkolumn är avsedd att simulera vindavdrift av bekämpningsmedel och täcker den inledande toppkoncentrationen i porvatten. Metoden är också användbar för andra typer av exponering (inklusive kemikaliespill), med undantag för ackumuleringsprocesser som är längre än testperioden.

3. Ämnen som behöver testas på sedimentlevande organismer är sådana som i allmänhet blir kvar i sedimentet under långa tidsperioder. De sedimentlevande organismerna kan exponeras via ett antal rutter. Den relativa betydelsen av varje exponeringsrutt och den tid det tar för var och en av dem att bidra till de totala toxiska effekterna beror på den berörda kemikaliens fysikalkemiska egenskaper. För starkt adsorberande ämnen (t.ex. log K_{ow} > 5) eller för ämnen som binds kovalent till sedimentet, kan förtäring av förorenad föda vara en betydande exponeringsrutt. För att toxiciteten hos starkt lipofila ämnen inte ska underskattas kan tillsättning av föda till sedimentet före applicering av testämnet övervägas. För att alla potentiella exponeringsrutter ska beaktas har denna testmetod fokus på långvarig exponering. Testets längd är 20–28 dagar för C. *riparius* och C. *yoshimatsui* och 28–65 dagar för C. *tentans*. Om korttidsdata krävs för ett specifikt ändamål, t.ex. för att undersöka effekterna av instabila kemikalier, kan tilläggsreplikat avlägsnas efter tio dagar.

4. De endpoints som mäts är det totala antalet kläckta vuxna exemplar och utvecklingstiden fram till kläckning. Det rekommenderas att mätningar av larvernas överlevnad och tillväxt endast görs efter en tiodagarsperiod i fall där ytterligare korttidsdata krävs, med användning av ytterligare replikat enligt vad som är lämpligt.

5. För detta test rekommenderas syntetiskt sediment. Syntetiskt sediment har flera fördelar jämfört med naturliga sediment:

   — Variationen mellan testningar reduceras eftersom syntetiskt sediment bildar en reproducerbar ”standardmatris”, och behovet av att få fram oförorenade och rena sediment elimineras.

   — Testningen kan inledas när som helst utan att beakta säsongvariationer i testsedimentet och det behövs ingen förbehandling av sediment för att få bort naturligt förekommande fauna. När syntetiskt sediment används uppstår heller inte kostnader för insamling på fältet av tillräckliga mängder sediment för rutintestning.

▼M4

— Användning syntetiskt sediment ger möjlighet till jämförelser av toxicitet och därmed klassificering av ämnen. Toxicitetsdata från tester med naturliga och syntetiska sediment har visat sig vara jämförbara för flera kemikalier (2).

6. Definitioner finns i tillägg 1.

PRINCIP FÖR TESTMETODEN

7. Första stadiets chironomidlarver exponeras för ett urval koncentrationer av testämnet i ett sediment-vattensystem. Testet inleds genom att tillsätta första stadiets larver i testbägare som innehåller ett sediment-vatten-system och därefter spika vattnet med testämnet. Kläckning av fullbildade myggor och utvecklingshastighet mäts i slutet av testet. Överlevande larver och deras vikt kan också mätas efter tio dagar om så krävs (med användning av ytterligare replikat enligt det som är lämpligt). Dessa data analyseras med användning av en regressionsmodell för att uppskatta den koncentration som skulle orsaka × % minskning av antalet fullbildade myggor eller av larvernas överlevnad eller tillväxt (EC_{15}, EC_{50} osv.) eller genom användning av statistisk hypotesprövning för att bestämma NOEC/LOEC. För hypotesprövningen krävs en jämförelse mellan effektvärden och kontrollvärden med användning av statistiska test.

INFORMATION OM TESTÄMNET

8. Testämnets vattenlöslighet, ångtryck, uppmätt eller beräknad fördelning i sedimentet samt stabilitet i vatten och sediment bör vara kända. Det bör finnas en tillförlitlig analysmetod för kvantifiering av testämnet i överliggande vatten, porvatten och sediment med känd och rapporterad exakthet och detektionsgräns. Det är också bra att känna till testämnets strukturformel och renhet. Hur testämnet agerar kemiskt (t.ex. upplösning, abiotisk och biotisk nedbrytning osv.) hör också till den information som är användbar. Närmare vägledning för testning av ämnen vars fysikalkemiska egenskaper gör det svårt att genomföra detta test finns i (12).

REFERENSKEMIKALIER

9. Referenskemikalier kan testas periodiskt för att säkerställa att testprotokollet och testbetingelserna är tillförlitliga. Exempel på toxiska referensämnen som med framgång har använts i ringtest och valideringsstudier är lindan, trifluranid, pentaklorfenol, kadmiumklorid och kaliumklorid (1) (2) (5) (6) (13).

TESTETS GILTIGHET

10. För att testet ska vara giltigt gäller följande villkor:

— Kläckningen av vuxna exemplar i kontrollkärlen måste vara minst 70 % i slutet av testet (1) (6).

— Kläckningen av vuxna exemplar av *C. riparius* och *C. yoshimatsui* i kontrollkärlen bör inträffa 12–24 dagar efter att de har införts i kärlen, för *C. tentans* krävs en period på 20–65 dagar.

— Vid slutet av testet bör pH och koncentrationen upplöst syre mätas i varje kärl. Syrekoncentrationen bör vara minst 60 % av luftmättnadsvärdet (ASV) vid den använda temperaturen och pH i överliggande vatten bör vara 6–9 i alla testkärl.

▼M4

— Variationen i vattentemperatur får inte vara större än ± 1,0 °C. Vattentemperaturen kan kontrolleras genom att göra testningen i ett isotermiskt utrymme, varvid rumstemperaturen bör kontrolleras med lämpliga tidsintervall.

METODBESKRIVNING

Testkärl

11. Testet görs i 600 ml-glasbägare med 8 cm i diameter. Även andra slags kärl kan användas, men då måste det gå att garantera att överliggande vatten och sediment har lämpliga djup. Sedimentytan bör vara tillräckligt stor för att ge 2–3 cm^2 per larv. Förhållandet mellan sedimentskiktets djup och överliggande vattnets djup bör vara 1:4. Testkärl och annan apparatur som kommer i kontakt med testsystemet bör vara gjorda av glas eller annat kemiskt inert material (t.ex. teflon).

Val av arter

12. Den art som används i testet ska helst vara *Chironomus riparius*. *Chironomus tentans* kan också vara lämplig, men den är svårare att hantera och kräver en längre testperiod. Även *Chironomus yohimatsui* kan användas. I tillägg 2 finns närmare uppgifter om odlingsmetoder för *Chironomus riparius*. Information om odlingsbetingelser finns också för andra arter, t.ex. *Chironomus tentans* (4) och *Chironomus yoshimatsui* (11). Arternas identifiering måste bekräftas före testningen men är inte nödvändig före varje test om organismerna härrör från en odling inom laboratoriet.

Sediment

13. Helst ska syntetiskt sediment användas. Om naturligt sediment används bör dess egenskaper bestämmas (minst pH, halten organiskt kol, och gärna även andra parametrar såsom förhållandet C/N och granulometri). Sedimentet måste även vara fritt från föroreningar och andra organismer som kan konkurrera med eller konsumera chironomiderna. Dessutom rekommenderas att naturligt sediment som är avsett att användas i ett chironomidtoxicitetstest konditioneras i sju dagar under samma betingelser som råder i det efterföljande testet. Följande syntetiska sediment, baserat på den syntetiska jord som används i testmetod C.8 (14) rekommenderas för detta test (1) (15) (16):

a) 4–5 % (torrvikt) torv så nära pH 5,5–6 som möjligt; det är viktigt att använda endast lufttorkad och finmalen torv i pulverform (partikelstorlek ≤ 1 mm).

b) 20 % (torrvikt) kaolinlera (kaolinithalt helst över 30 %).

c) 75–76 % (torrvikt) kvartssand (till största del bestående av fin sand där mer än 50 % av partiklarna har storleken 50–200 μm).

d) Avjoniserat vatten tillsätt så att blandningen får en slutlig fukthalt på 30–50 %.

e) Kemiskt rent kalciumkarbonat $CaCO_3$) tillsätts för att justera den slutliga sedimentblandningens pH till 7,0 ± 0,5.

f) Den slutliga blandningens kolhalt bör vara 2 % ± 0,5 % och kan justeras med hjälp av lämpliga mängder torv och sand, enligt punkterna a och c.

▼M4

14. Torv, kaolinlera och sand ska härröra från kända källor. Sedimentkomponenterna bör kontrolleras för att bekräfta avsaknaden av kemiska föroreningar (t.ex. tungmetaller, organiska klorföreningar, organiska fosforföreningar osv.) Ett exempel på hur syntetiskt sediment kan tillredas beskrivs i tillägg 3. Det är också godtagbart att blanda torra beståndsdelar om det går att demonstrera att tillsats av överliggande vatten inte leder till att sedimentets beståndsdelar separerar (t.ex. flytande torvpartiklar) och att torven eller sedimentet konditioneras tillräckligt.

Vatten

15. Allt vatten som uppfyller de kemiska kriterierna för godtagbart utspädningsvatten (se tilläggen 2 och 4) är lämpligt som testvatten. Allt lämpligt vatten, naturligt vatten (ytvatten eller grundvatten), rekonstituerat vatten (se tillägg 2) och avklorerat kranvatten är godtagbart som odlings- och testvatten om chironomiderna överlever i det under odling, acklimatisering och testning utan att uppvisa tecken på stress. Vid teststart ska testvattnets pH vara mellan 6 och 9 och totalhårdheten får inte vara högre än 400 mg/l uttryckt som $CaCO_3$. Om man misstänker växelverkan mellan hårdhetsjoner och testämnet, bör vatten med lägre hårdhet användas (i en sådan situation får Elendt Medium M4 inte användas). Samma typ av vatten bör användas under hela testningen. De vattenkvalitetsegenskaper som förtecknas i tillägg 4 bör mätas minst två gånger om året eller om man misstänker att egenskaperna har ändrats betydligt.

Stamlösningar – spikat vatten

16. Testkoncentrationerna beräknas på grundval av vattenkolumnens koncentrationer, dvs. det vatten som ligger över sedimentet. Testlösningar för de valda koncentrationerna bereds i regel genom utspädning av en stamlösning. Stamlösningarna ska helst beredas genom upplösning av testämnet i ett testmedium. I vissa fall kan det krävas lösningsmedel eller dispergeringsmedel för att få en stamlösning med lämplig koncentration. Exempel på lämpliga lösningsmedel är aceton, etanol, metanol, etylenglykolmonoetyleter, etylenglykoldimetyleter, dimetylformamid och trietylenglykol. Dispergeringsmedel som kan användas är Cremofor RH40, Tween 80, metylcellulosa 0,01 % och HCO-40. Lösningsmedlets koncentration i det slutliga testmediet bör vara minimal (t.ex. $\leq$ 0,1 ml/l) och bör vara samma för alla behandlingar. Om lösningsmedel används, får det inte ha någon betydande effekt på överlevnad eller synliga skadliga effekter på chironomidlarverna, vilket kan verifieras genom en kontroll med enbart lösningsmedel. Man bör dock in i det sista undvika att använda dessa medel.

TESTETS UTFORMNING

17. Testets utformning avser antalet koncentrationer och intervallen mellan dem, antalet kärl per koncentration och antalet larver per kärl. Här beskrivs utformningar för uppskattning av effektkoncentration, uppskattning av NOEC och för gränstest. Regressionsanalys rekommenderas för att testa hypotesen.

Utformning för regressionsanalys

18. Effektkoncentrationen (t.ex. EC_{15}, EC_{50}) och det koncentrationsområde som är relevant för testämnet bör omfattas av de koncentrationer som ingår i testet. Allmänt taget gäller att exaktheten och särskilt giltigheten för uppskattningar av effektkoncentrationer (EC_x) förbättras när effektkoncentrationen ligger inom området för de koncentrationer som testas. Extrapolering

▼M4

under lägsta positiva koncentration eller över högsta koncentration bör undvikas. Preliminära test kan användas för att hitta rätt koncentrationsområde (se punkt 27).

19. Om EC_x ska uppskattas bör testet omfatta minst fem koncentrationer och tre replikat för varje koncentration. Det är under alla omständigheter tillrådligt att använda tillräckligt många testkoncentrationer för att få en god modelluppskattning. Faktorn mellan koncentrationer bör inte vara större än två (undantag kan göras i fall där dos-responskurvan har liten lutning). Antalet replikat per behandling kan minskas om antalet testkoncentrationer med olika respons ökas. En ökning av antalet replikat eller minskning av testkoncentrationsintervall tenderar att leda till ett smalare konfidensintervall för testet. Ytterligare replikat krävs om en uppskattning ska göras av larvernas överlevnad och tillväxt under en tiodagarsperiod.

Upplägg för uppskattning av NOEC/NOEC

20. Om LOEC eller LOEC ska uppskattas bör det finnas fem testkoncentrationer med minst fyra replikat och faktorn mellan koncentrationerna får inte vara större än två. Antalet replikat bör vara tillräckligt för att säkerställa tillräcklig statistisk styrka för att upptäcka en skillnad på 20 % jämfört med kontrollen vid nivån 5 % för signifikans (p = 0,05). För uppskattning av utvecklingshastighet är det i regel lämpligt med variansanalys (ANOVA), såsom Dunnets eller Williams test (17) (18) (19) (20). För kläckningsfrekvens kan ett Cochran-Armitage-test, Fishers exakta test (med Bonferronikorrigering) eller ett Mantel-Haenszel-test användas.

Gränstest

21. Gränstest kan göras (en testkoncentration och kontroll) om inga effekter framkommit vid det preliminära testet för att fastställa testområde. Syftet med gränstest är att få indikation om att testämnets toxiska värde är högre än den testade gränskoncentrationen. Inga förslag på rekommenderade koncentrationer kan ges i denna testmetod, utan frågan måste bedömas av tillsynsmyndigheterna. I regel krävs minst sex replikat både för behandling och kontroll. Man måste kunna demonstrera tillräcklig statistisk styrka för att upptäcka en skillnad på 20 % jämfört med kontrollen vid nivån 5 % för signifikans (p = 0,05). Eftersom t-test ger kvantitativ respons (utvecklingshastighet och vikt) är t-test en lämplig statistisk metod förutsatt att data uppfyller testkraven (normalitet, homogena varianser osv.). Om dessa krav inte uppfylls kan man använda t-testet med olika varians eller ett icke-parametriskt test, såsom Wilcoxon-Mann-Whitneys test. För kläckningsfrekvens är det lämpligt att använda Fischers exakta test.

FÖRFARANDE

Exponeringsbetingelser

Beredning av systemet med spikat vatten och sediment

22. Lämpliga mängder syntetiskt sediment (se punkterna 13 och 14 och tillägg 3) tillförs testkärlet så att det bildas ett lager på minst 1,5 cm. Vatten tillsätts till ett djup på 6 cm (se punkt 15). Förhållandet mellan sedimentskiktets djup och vattenskiktets djup ska inte överskrida 1:4 och sedimentskiktet ska inte vara djupare än 3 cm. Systemet sediment-vatten bör hållas under skonsam luftning i sju dagar före tillsats av testorganismer (se punkt 14 och tillägg 3). För att undvika separation av sedimentets beståndsdelar och återsuspension av finfördelat material medan testvatten tillsätts i vattenkolumnen, kan sedimentet täckas med en plastplatta medan vattnet tillsätts, varefter plattan avlägsnas omedelbart. Även andra metoder kan vara lämpliga.

▼M4

23. Testkärlen bör vara täckta (t.ex. med glasplattor). Vid behov fylls under testets gång vatten på till ursprunglig volym för att kompensera för avdunstning. Detta bör göras med destillerat eller avjoniserat vatten för att förebygga ackumulering av salter.

Tillförsel av testorganismer

24. Fyra till fem dagar innan testorganismerna tillförs testkärlen ska äggmassorna avlägsnas från odlingarna och placeras i små kärl i odlingsmedium. Åldrat medium från stamodling eller färskt berett medium kan användas. Om färskt medium används bör en liten mängd föda, t.ex. grönalger och/eller några droppar filtrat från en finmald suspension av fiskfoder i flingform tillsättas odlingsmediet (se tillägg 2). Endast färska äggmassor får användas. I regel börjar larverna kläckas några dagar efter att äggen har lagts (2–3 dagar för *Chironomus riparius* vid 20 °C och 1–4 dagar för *Chironomus tentans* vid 23 °C och *Chironomus yoshimatsui* vid 25 °C), och larvernas tillväxt sker i fyra stadier på 4–8 dagar per stadium. För testet ska första stadiets larver användas (2–3 eller 1–4 dagar efter kläckningen). Bestämning av larvstadium kan möjligen göras genom mätning av huvudkapseldiameter (6).

25. Tjugo första stadiets larver fördelas slumpvis till varje testkärl som innehåller spikat sediment och vatten, med användning av en trubbig pipett. Luftningen av vattnet måste stoppas medan larverna tillsätts testkärlen och hållas stoppad i ytterligare 24 timmar efter tillsättningen (se punkterna 24 och 32). Enligt det testupplägg som används (se punkterna 19 och 20) är antalet larver per testkoncentration minst 60 för uppskattning av EC-punkt och 80 för bestämning av NOEC.

26. Tjugofyra timmar efter tillsättning av larverna spikas den överliggande vattenkolumnen med testämnet, och en lätt luftning införs på nytt. Små volymer av testämnet tillsätts under vattenytan med hjälp av en pipett. Därefter görs försiktig omrörning av det överliggande vattnet utan att störa sedimentet.

Testkoncentrationer

27. Ett preliminärt test kan användas för att fastställa koncentrationerna för det definitiva testet. För detta ändamål används en serie brett spridda koncentrationer av testämnet. För att få samma ytdensitet per chironomid som ska användas för det slutliga testet, exponeras chironomiderna för varje koncentration av testämnet under en period som ger möjlighet att uppskatta lämpliga testkoncentrationer. Inga replikat krävs.

28. Testkoncentrationerna för det definitiva testet baseras på resultaten från det preliminära testet. Det ska finnas minst fem testkoncentrationer som väljs enligt beskrivningen i punkterna 18–20.

Kontrollkärl

29. Kontrollkärl som inte innehåller testämne utan enbart sediment bör ingå i testet med lämpligt antal replikat (se punkterna 19–20). Om lösningsmedel har använts för applicering av testämnet (se punkt 16) bör det också finnas kontrollkärl med sediment och lösningsmedel.

▼M4

Testsystem

30. De system som används är statiska. Semistatiska system eller genomflödessystem med intermittent eller kontinuerlig förnyelse av överliggande vatten kan användas i undantagsfall, t.ex. om vattenkvalitetsspecifikationerna inte är lämpliga för testorganismen eller påverkar den kemiska jämvikten (t.ex. om syrenivåerna blir för låga, koncentrationen av utsöndrade produkter blir för hög eller om mineraler som släpps ut från sediment påverkar pH och/eller vattenhårdheten). I regel är det dock tillräckligt och rekommendabelt att använda andra metoder för kompensering av kvaliteten på överliggande vatten, såsom luftning.

Foder

31. Larverna bör ges foder helst dagligen eller minst tre gånger per vecka. Fiskfoder (suspension i vatten eller finmalt foder, t.ex. Tetra-Min eller Tetra-Phyll, se närmare i tillägg 2) i mängder om 0,25–0,5 mg (0,35–0,5 mg för C. *yoshimatsui*) per larv per dag anses vara lämpligt för unga larver under de tio första dagarna. För äldre larver kan det krävas lite större mängd: 0,5–1 mg per larv och dag bör vara tillräckligt för återstoden av testet. Mängden bör minskas för alla behandlingar och kontroller om det uppstår svamptillväxt eller mortalitet observeras i kontrollerna. Om svamptillväxten inte kan stoppas måste testet upprepas. Vid testning av starkt adsorberande ämnen (t.ex. log K_{ow} > 5) eller ämnen som är kovalent bundna till sedimentet, kan mängden foder som krävs för att säkerställa överlevnad och naturlig tillväxt för organismerna tillsättas i det syntetiska sedimentet före stabiliseringsperioden. Då ska växtmaterial användas i stället för fiskfoder, t.ex. 0,5 % (torrvikt) finmalda löv från t.ex. brännässla (*Urtica dioica*), mullbär (*Morus alba*), vitklöver (*Trifolium repens*), spenat (*Spinacia oleracea*) eller annat växtmaterial (*Cerophyl* eller *alfacellulosa*).

Inkubationsbetingelser

32. Skonsam luftning av överliggande vatten i testkärlen införs helst 24 timmar efter tillsättning av larverna och får pågå genom hela testet (se till att halten upplöst syre inte faller under 60 % av luftmättnadsvärdet ASV). Luftningen görs med hjälp av en Pasteur-glaspipett som är fäst 2–3 cm ovanför sedimentskiktet (en eller ett fåtal bubblor per sekund). Vid testning av flyktiga kemikalier kan man överväga att utesluta luftning av sediment-vattensystemet.

33. Testet genomförs vid konstant temperatur på 20 °C (± 2 °C). För C. tentans och C. yoshimatsui rekommenderas temperaturer på 23 °C respektive 25 °C (± 2 °C). En ljusperiod på 16 timmar används och ljusintensiteten ska vara 500–1 000 lux.

Exponeringstid

34. Exponeringen inleds när larver tillsätts i spikade kärl och kontrollkärl. Den maximala exponeringstiden är 28 dagar för C. *riparius* och C. *yoshimatsui* och 65 dagar för C. *tentans*. Om myggor kläcks tidigare, kan testet avslutas efter minst fem dagar efter att det sista vuxna exemplaret har kläckts i kontrollen.

OBSERVATIONER

Kläckning

35. Utvecklingstiden och totalantalet fullbildade han- och honmyggor bestäms. Hanarna är lätta att känna igen på sina fjäderantenner.

▼M4

36. Testkärlen bör granskas visuellt minst tre gånger i veckan för att bedöma förekomsten av onormalt beteende (t.ex. exemplar som lämnar sedimentet, ovanligt simmande) jämfört med kontrollen. Under perioden för förväntad kläckning är det nödvändigt att dagligen räkna antalet kläckta exemplar. Kön och antal fullbildade exemplar registreras dagligen. Efter identifiering avlägsnas myggorna från kärlen. Ägg som har deponerats före testets slutförande bör registreras och därefter avlägsnas för att förhindra att larver på nytt introduceras i sedimentet. Likaså ska registrering göras av antalet synliga puppor som inte har kläckts. Vägledning om övervakning av kläckning finns i tillägg 5.

Tillväxt och överlevnad

37. Om det krävs data om överlevnad och tillväxt under en tiodagarsperiod bör ytterligare testkärl införlivas från början, så att dessa därefter kan användas. Larverna i sedimentet från dessa tilläggskärl tillvaratas genom sållning med ett 250 μm-såll. Kriterierna för död är orörlighet eller utebliven reaktion på mekanisk stimulans. Larver som inte tillvaratas bör räknas som döda (larver som har dött i början av testet kan ha sönderdelats av mikrober). Torrvikten (askfri) för överlevande larver per testkärl bestäms och den genomsnittliga individuella torrvikten per kärl beräknas. Det är bra att bestämma vilket stadium överlevande larver tillhör, och för detta kan mätning av huvudkapselns bredd användas.

Analytiska mätningar

Testämnets koncentration

38. Som ett minimum bör prover av överliggande vatten, porvatten och sediment analyseras i början (helst inom en timme från tillsats av testämne) och i slutet av testet, för den högsta koncentrationen och för en lägre koncentration. Dessa bestämningar av testämneskoncentration ger information om testsubstansens beteende/fördelning i vatten-sedimentsystemet. Provtagning av sediment vid testets början kan påverka testsystemet (t.ex. genom att larver avlägsnas) och därför måste ytterligare testkärl användas för analytiska bestämningar vid testets start samt under testets gång om så är lämpligt (se punkt 39). Mätningar i sedimentet är eventuellt inte nödvändiga om fördelningen av testämnet mellan vatten och sediment har fastställts tydligt under motsvarande betingelser (t.ex. förhållandet mellan sediment och vatten, typ av applicering, sedimentets halt av organiskt kol).

39. Om mellanliggande mätningar görs (t.ex. dag 7) och om det för analysen krävs stora prover som inte kan tas från testkärlen utan att testsystemet påverkas, bör de analytiska bestämningarna göras på prover som tas från extra testkärl som behandlas på samma sätt (inklusive förekomst av testorganismer) men som inte används för biologiska observationer.

40. Centrifugering vid t.ex. 10 000 g och 4 °C i 30 minuter är det rekommenderade förfarandet för att isolera porvatten. Om det har demonstrerats att testämnet inte adsorberas på filter kan även filtrering godtas. I vissa fall är det kanske inte möjligt att analysera koncentrationerna i porvattnet därför att provet är för litet.

▼M4

Fysikalkemiska parametrar

41. Mätning bör göras av pH, upplöst syre i vattnet och temperatur i testkärlen på lämpligt sätt (se punkt 10). Hårdhet och ammonium bör mätas i kontrollerna och ett testkärl vid den högsta koncentrationen i början och slutet av testet.

DATA OCH RAPPORTERING

Behandling av resultaten

42. Syftet med detta test är att bestämma testämnets effekt på utvecklingshastigheten och totalantalet fullbildade han- och honmyggor eller, om det gäller ett tiodagarstest, effekterna på larvernas överlevnad och vikt. Om det inte finns indikationer på statistiskt avvikande känslighet för hanar och honor, kan resultaten poolas för statistiska analyser. Känslighetsskillnaderna mellan hanar och honor kan bedömas statistiskt t.ex. genom ”χ^2-r × 2 table test”. Larvernas överlevnad och genomsnittlig individuell torrvikt per kärl måste bestämmas efter tio dagar där detta krävs.

43. Effektkoncentrationerna uttryckta som koncentrationer i överliggande vatten beräknas helst på grundval av uppmätta sedimentkoncentrationer vid testets början (se punkt 38).

44. För att beräkna en punktvis uppskattning av EC_{50} eller något annat EC_x-värde, kan statistiken per kärl användas som äkta replikat. Vid beräkning av konfidensintervallet för ett EC_x-värde bör variansen mellan kärl beaktas, eller så bör man påvisa att variansen är så liten att den kan ignoreras. Om modellen anpassas med minsta kvadratmetoden bör transformation tillämpas på den kärlvisa statistiken i syfte att förbättra variansens homogenitet. EC_x-värdena bör dock beräknas när responsen har transformerats tillbaka till det ursprungliga värdet.

45. När syftet med den statistiska analysen är att bestämma NOEC/LOEC genom hypotestestning, måste variansen mellan kärl beaktas, t.ex. genom nästad ANOVA. Alternativt kan mer robust testning (21) vara lämplig i situationer där de vanliga ANOVA-antagandena inte gäller.

Kläckningsfrekvens

46. Kläckningsfrekvenser är dikotoma (tvåpunktsfördelade) data och kan analyseras genom Cochran-Armitage test som tillämpas på step-down-grund där monoton dos-respons förväntas och dessa data stämmer överens med förväntningen. Om inte, kan Fishers exakta test eller ett Mantel-Haenszel-test med Bonferroni-Holm-korrigerade p-värden användas. Om det finns bevis på större variation mellan replikat inom samma koncentration än det som en binomial fördelning skulle indikera (ofta kallad extra-binomial fördelning), bör ett robust Cochran-Armitage-test eller Fischers exakta test användas, enligt det som föreslås i punkt 21.

47. Det totala antalet myggor som kläckts per kärl, n_e, bestäms och divideras med antalet tillsatta larver, n_a enligt följande:

$$ER = \frac{n_e}{n_a}$$

▼M4

där:

ER = kläckningsfrekvensen

n_e = antalet myggor som kläckts per kärl

n_a = antalet larver som tillsatts per kärl

48. Ett alternativ som bäst lämpar sig för stora provstorlekar, när det finns extrabinomial varians, är att behandla kläckningsfrekvensen som en kontinuerlig respons och använda förfaranden såsom William-test när monoton dos-respons förväntas och stämmer överens med dessa data för kläckningsfrekvens. Dunnett-test är lämpligt i fall där det inte är hållbart med monotonicitet. I detta sammanhang definieras begreppet ”stort prov” som ett prov där antalet kläckta och antalet inte kläckta överstiger fem, per replikatkärl.

49. Vid användning av ANOVA-metoder bör värdena för kläckningsfrekvens först transformeras genom arcsin-kvadratsrotstransformation eller Freeman-Tukeytransformation för att få en ungefärlig normalfördelning och jämna ut varianserna. Cochran-Armitage-test, Fishers exakta test (Bonferroni) eller Mantel-Haenszel-test kan användas när absoluta frekvenser används. För att göra arcsin-kvadratrotstransformation tar man inverterad sinus ($\sin^{-1}$) av kvadratroten av kläckningsfrekvensen.

50. EC_x-värden för kläckningsfrekvenser beräknas med regressionsanalys (t.ex. probit (22), logit, Weibull, lämplig kommersiell mjukvara eller dylikt). Om regressionsanalysen inte lyckas (om det t.ex. finns mindre än två partiella responser) används andra icke-parametriska metoder såsom glidande medelvärde eller enkel interpolering.

Utvecklingshastighet

51. Med genomsnittlig utvecklingstid avses den genomsnittliga tidsomfattningen mellan tillsättning av larver (testdag 0) och kläckningen av den experimentella kohorten myggor (för beräkning av den faktiska utvecklingstiden bör man beakta larvernas ålder vid tillsättningstidpunkten). Värdet för utvecklingshastighet är det reciproka värdet av tidsenheten för utveckling: (enhet: 1/dag) och representerar den andel larvutveckling som sker per dag. Utvecklingshastigheten är det mått som helst ska användas för utvärdering av dessa sedimenttoxicitetsstudier eftersom variansen är lägre och homogenare samt närmare normalfördelningen i jämförelse med utvecklingstiden. Kraftfulla parametriska testförfaranden kan alltså användas baserade på utvecklingshastighet hellre än på utvecklingstid. För utvecklingshastighet som en kontinuerlig respons kan EC_x-värden uppskattas med hjälp av regressionsanalys (t.ex. (23), (24)).

52. För efterföljande statistiska test antas antalet myggor observerade på inspektionsdag × ha kläckts i mitten av tidsintervallet mellan dag × och dag x-1 (l är inspektionsintervallets längd, i regel 1 dag). Genomsnittlig utvecklingshastighet per kärl (x) beräknas enligt följande:

$$\bar{x} = \sum_{i=1}^{m} \frac{f_i x_i}{n_e}$$

där:

$\bar{x}$: genomsnittlig utvecklingshastighet per kärl

i: index för inspektionsintervall

m: maximiantalet inspektionsintervall

▼M4

f_i: antalet myggor som kläckts under inspektionsintervallet i

n_e: totalantalet myggor som kläckts i slutet av experimentet (= $\sum f_i$)

x_i: utvecklingshastigheten för myggor som kläckts under intervallet i

$$x_i = \frac{1}{\left(day_i - \frac{l_i}{2}\right)}$$

där:

dag_i: inspektionsdag (dagar från appliceringen)

l_i: inspektionsintervallets längd i (dagar, i regel 1 dag)

Testrapport

53. Testrapporten ska innehålla minst följande uppgifter:

Testämne:

— Fysikalisk natur och, där det är relevant, fysikalkemiska egenskaper (vattenlöslighet, ångtryck, fördelningskoefficient i jord (eller i sediment, om tillgänglig), stabilitet i vatten osv.).

— Kemiska identifieringsdata (trivialnamn, kemiskt namn, strukturformel, CAS-nummer osv.) samt renhet och analysmetod för kvantifiering av testämnet.

Testarter:

— Organismer som använts för testet: art, vetenskapligt namn, ursprung och odlingsbetingelser.

— Information om hantering av äggmassor och larver.

— Organismernas ålder när de tillförs testkärlen.

Testbetingelser:

— Sediment som använts (naturligt eller syntetiskt).

— För naturligt sediment, insamlingsplatsens belägenhet och beskrivning av sedimentet, inbegripet i mån av möjlighet föroreningshistoria och egenskaper: pH, halten organiskt kol, C/N-kvot och granulometri (om lämpligt).

— Beredning av syntetiskt sediment: beståndsdelar och egenskaper (halten organiskt kol, pH, fukthalt osv. vid testets början).

— Beredning av testvatten (om rekonstituerat vatten används) och egenskaper (syrehalt, pH, konduktivitet, hårdhet osv. vid testets början).

— Sedimentets och överliggande vattnets djup.

— Volymen för överliggande vatten och porvatten, vikten för vått sediment med och utan porvatten.

— Testkärl (material och storlek).

— Metod för beredning av stamlösningar och testkoncentrationer.

▼M4

— Tillsättning av testämne: antalet koncentrationer, antalet replikat och, i förekommande fall, använt lösningsmedel.

— Inkubationsbetingelser: temperatur, ljuscykel och intensitet, luftning (frekvens och intensitet).

— Detaljerad information om utfodringen, inklusive typ av foder, beredning, mängd och utfodringsschema.

Resultat:

— Nominella testkoncentrationer, uppmätta testkoncentrationer och resultaten av alla analyser för bestämning av testämnets koncentration i testkärl.

— Vattenkvaliteten i testkärlen – pH, temperatur, upplöst syre, hårdhet och ammonium.

— Ersättning av avdunstat testvatten, i förekommande fall.

— Antalet kläckta hon- och hanmyggor per kärl och dag.

— Antalet larver som inte utvecklats till myggor, per kärl.

— Genomsnittlig individuell torrvikt för larver per kärl och per stadium, om lämpligt.

— Procentandel kläckta exemplar per replikat- och testkoncentration (han- och honmyggor poolade).

— Genomsnittlig utvecklingshastighet för fullbildade myggor per replikat och behandlingsnivå (han- och honmyggor poolade).

— Uppskattning av toxiska endpoints t.ex. EC_x (och associerade konfidensintervall), NOEC och/eller LOEC, och statistiska metoder som använts för bestämning av dem.

— Diskussion av resultaten, inbegripet inverkan på testresultatet som kan tillskrivas avvikelser från denna testmetod.

LITTERATUR

(1) BBA (1995), ”Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system”, redigerat av M. Streloke och H. Köpp. Berlin 1995.

(2) Fleming R. m.fl. 1994), ”Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances”, Slutlig rapport till Europeiska kommissionen, rapport nr EC 3738, augusti 1994, WRc, UK.

(3) SETAC (1993), ”Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments”, WOSTA Workshop, Nederländerna.

(4) ASTM International/E1706-00 (2002), ”Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates”, s. 1125–1241, *ASTM International 2002 Annual Book of Standards*, vol. 11.05, ”Biological Effects and Environmental Fate;Biotechnology; Pesticides”, ASTM International, West Conshohocken, PA.

(5) Environment Kanada (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”, andra utgåvan, *EPA 600/R-99/064*, mars 2000, revidering av första utgåvan juni 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 K. E., McLeay D. J. och Kirby R. S. (1996), ”Recent intra- and inter-laboratory studies related to the development and standardisation of Environment Kanada’s biological test methods for measuring sediment toxicity using freshwater amphipods *(Hyalella azteca)* and midge larvae *(Chironomus riparius)*” Technical Report, Environment Kanada, National Water Research Institute, Burlington, Ontario, Kanada.

(10) Sugaya Y. (1997), ”Intra-specific variations of the susceptibility of insecticides *in Chironomus yoshimatsui*”, *Jp. J. Sanit. Zool.* 48 (4), s. 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), s. 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* Nr 23.

(13) Environment Kanada (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 denna bilaga, Toxicitet hos daggmaskar.

(15) Suedel B. C. och Rodgers J. H. (1994), ”Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing”, *Environ. Toxicol. Chem.* 13, s. 1163–1175.

(16) Naylor C. och Rodrigues C., (1995), ”Development of a test method for Chironomus riparius using a formulated sediment”, *Chemosphere* 31, s. 3291–3303.

(17) Dunnett C. W. (1964), ”A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control”, *J. Amer. Statis. Assoc.* 50, s. 1096–1121.

(18) Dunnett C. W. (1964), ”New tables for multiple comparisons with a control”, *Biometrics*, 20, s. 482–491.

(19) Williams D. A. (1971), ”A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control”, *Biometrics*, 27, s. 103–117.

(20) Williams D. A. (1972), ”The comparison of several dose levels with a zero dose control”, *Biometrics*, 28, s. 510–531.

(21) Rao J. N. K. och Scott A. J. (1992), ”A simple method for the analysis of clustered binary data”, *Biometrics* 48, s. 577–585.

(22) Christensen E. R. (1984), ”Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model”, *Water Research* 18, s. 213–221.

(23) Bruce och Versteeg (1992), ”A statistical procedure for modelling continuous toxicity data”, *Environmental Toxicology and Chemistry* 11, s. 1485–1494.

(24) Slob W. (2002), ”Dose-response modelling of continuous endpoints”, *Toxicol. Sci.* 66, s. 298–312.

▼**M4**

Tillägg 1

DEFINITIONER

I denna testmetod gäller följande definitioner:

syntetiskt sediment: rekonstituerat, konstgjort sediment som är en blandning av material avsedda att efterlikna de fysiska beståndsdelarna i naturligt sediment.

överliggande vatten: det vatten som hålls ovanför sedimentet i testkärlet.

porvatten: det vatten som finns i mellanrummen mellan sediment- och jordpartiklar.

spikat sediment: sediment med tillsatt testämne.

testkemikalie: alla ämnen eller blandningar som testas med denna testmetod.

▼M4

Tillägg 2

Rekommendationer för odling av *Chironomus riparius*

1. *Chironomus*-larver kan odlas i kristalliseringskärl eller stora behållare. Fin kvartssand sprids som ett tunt skikt på cirka 5–10 mm på behållarens botten. Även kiselgur (t.ex. Merck, Art. 8117) har visat sig vara ett lämpligt substrat (det räcker med ett tunt lager på några mm). Lämpligt vatten tillsätts till ett djup på flera cm. Vattennivåerna bör fyllas på efter behov för att ersätta avdunstning och förebygga uttorkning. Vattnet kan vid behov ersättas. Det bör finnas en skonsam luftning. De kärl som innehåller larver bör hållas i en lämplig bur som hindrar vuxna exemplar från att rymma. Buren bör vara tillräckligt stor för att de vuxna exemplaren ska kunna svärma, annars kan kopulation utebli (minimum är cirka 30 × 30 ×30 cm).

2. Burarna ska hållas i rumstemperatur eller ett tempererat utrymme vid 20 ± 2 °C med en ljusperiod på 16 timmar (intensitet ca 1 000 lux) och 8 timmar mörker. Det har rapporterats att luftfuktighet under 60 % RH kan hämma reproduktion.

Utspädningsvatten

3. Allt lämpligt naturligt eller syntetiskt vatten kan användas. Ofta används källvatten, avklorerat kranvatten och artificiella medier (t.ex. Elendt M4 eller M7, se nedan). Vattnet måste luftas före användningen. Vid behov kan odlingsvattnet förnyas genom att försiktigt hälla eller sifonera använt vatten från odlingskärlen utan att förstöra larvrören.

Utfodring av larver

4. *Chironomus*-larverna ges fiskfoder i flingform (Tetra Min®, Tetra Phyll® eller motsvarande patenterat märke), cirka 250 mg per kärl och dag. Fodret kan ges i form av torrt malet pulver eller som suspension i vatten: 1,0 g flingfoder blandas med 20 ml utspädningsvatten till en homogen blandning. Beredningen kan ges med en dosering på cirka 5 ml per kärl och dag (skaka om före användning). Äldre larver kan få en större dos.

5. Utfodringen justeras enligt vattenkvaliteten. Om odlingsmediet blir grumligt bör dosen sänkas. Foderdoseringen måste övervakas noggrant. För liten mängd leder till att larverna emigrerar mot vattenkolumnen och för stor mängd leder till ökad mikrobiell aktivitet och lägre syrekoncentrationer. Båda omständigheterna kan leda till minskad tillväxt.

6. Även celler av vissa grönalger (t.ex. *Scenedesmus subspicatus*, *Chlorella vulgaris*) kan tillsättas när nya odlingskärl läggs upp.

Utfodring av vuxna exemplar

7. Vissa testutövare har föreslagit att bomullskompresser indränkta i mättad sukroslösning kan användas som foder för vuxna exemplar.

▼M4

Kläckning

8. Vid 20 ± 2 °C börjar vuxna exemplar kläckas i odlingskärlen efter cirka 13–15 dagar. Hanarna är lätta att känna igen på sina fjäderantenner.

Äggmassor

9. När vuxna exemplar finns i odlingsburen bör alla larver i odlingskärlen kontrolleras tre gånger per vecka för att se om gelatinösa äggmassor har deponerats. Om sådana upptäcks, bör de avlägsnas försiktigt. Äggmassorna överförs till ett litet kärl som innehåller ett prov av odlingsvattnet. De används sedan för att starta nya odlingskärl (t.ex. 2–4 äggmassor per kärl) eller för toxicitetstest.

10. Första stadiets larver bör kläckas efter 2–3 dagar.

Uppläggning av nya odlingskärl

11. När odlingarna är etablerade bör det vara möjligt att lägga upp en färsk larvodling veckovis eller med längre intervall beroende på testningskraven, och avlägsna äldre kärl efter att vuxna myggor har kläckts. På detta sätt fås regelbunden tillgång till vuxna exemplar med minimal insats.

Beredning av testlösningarna M4 och M7

12. M4-mediet upptäcktes av Elendt (1990). M7-mediet bereds på samma sätt som M4-mediet med undantag för de ämnen som anges i tabell 1, för vilka koncentrationerna är fyra gånger lägre i M7 jämfört med M4. En publikation om M7-mediet är under arbete (Elendt, personlig kommunikation). Testlösningen ska inte beredas enligt Elendt och Bias (1990) eftersom de angivna koncentrationerna av $NaSiO_3 \cdot 5H_2O$, $NaNO_3$, KH_2PO_4 och K_2HPO_4 inte är lämpliga.

Beredning av M7-medium

13. Varje stamlösning (I) bereds individuellt och en kombinerad stamlösning (II) bereds av dessa stamlösningar (I) (se tabell 1). Femtio ml av den kombinerade stamlösningen (II) och de mängder av varje stamlösning med makronäring som anges i tabell 2 och avjoniserat vatten tillsätts upp till 1 liter för att bereda M7-mediet. En stamlösning med vitaminer bereds genom att tillsätta tre vitaminer till avjoniserat vatten enligt tabell 3, och 0,1 ml av den kombinerade vitaminstamlösningen tillsätts till det slutliga M7-mediet strax före användningen (vitaminstamlösningen förvaras djupfryst i små alikvoter). Mediet luftas och stabiliseras.

Tabell 1

Stamlösningar av spårelement för M4- och M7-medium

Stamlösningar (I)	Mängd (mg) som byggs upp till 1 liter med avjoniserat vatten	Beredning av kombinerad stamlösning (II): blanda följande mängder (ml) stamlösning (I) och bygg upp till 1 liter med avjoniserat vatten		Slutliga koncentrationer i testlösningarna (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

▼**M4**

Stamlösningar (I)	Mängd (mg) som byggs upp till 1 liter med avjoniserat vatten	Beredning av kombinerad stamlösning (II): blanda följande mängder (ml) stamlösning (I) och bygg upp till 1 liter med avjoniserat vatten		Slutliga koncentrationer i testlösningarna (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
$CaCl_2 \cdot 2H_6O$	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
FeSO4 · 7H2O (1) (2)	1 991	20,0	5,0	1,0	0,249

(1) Dessa ämnen avviker i M4 och M7, såsom anges ovan.
(2) Dessa ämnen bereds individuellt, blandas och autoklaveras omedelbart.

Tabell 2

Stamlösningar med makronäringsämnen för medium M4 och M7

	Mängd som byggs upp till 1 liter med avjoniserat vatten (mg)	Mängd stamlösning med makronäringsämnen som tillsätts för att bereda medium M4 och M7 (ml/l)	Slutliga koncentrationer i testlösningarna M4 och 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

▼**M4**

Tabell 3

Stamlösningar med vitaminer för medium M4 och M7

Alla tre vitaminlösningar kombineras till en enda vitaminstamlösning.

	Mängd som byggs upp till 1 liter med avjoniserat vatten (mg)	Mängd stamlösning med vitaminer som tillsätts för att bereda medium M4 och M7 (ml/l)	Slutliga koncentrationer i testlösningarna M4 och M7 (mg/l)
Tiaminhydroklorid	750	0,1	0,075
Cyanokobalamin (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”, redigerat av M. Streloke och H. Köpp. Berlin 1995.

Elendt, B. P. (1990), ”Selenium Deficiency in Crustacean”, *Protoplasma* 154, s. 25–33.

Elendt B. P. och 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), s. 1157–1167.

▼M4

Tillägg 3

BEREDNING AV SYNTETISKT SEDIMENT

Sedimentsammansättning

Syntetiskt sediment ska ha följande sammansättning:

Beståndsdel	Egenskaper	% av sedimentets torrvikt
Torv	Sphagnum, så nära pH 5,5–6 som möjligt utan synliga växtrester och finfördelad (partikelstorlek ≤1 mm) och lufttorkad.	4–5
Kvartssand	Partikelstorlek: > 50 % av partiklarna bör ha storlek inom området 50–200 μm	75–76
Kaolinitlera	Kaolinithalt ≥ 30 %	20
Organiskt kol	Justeras genom tillsats av torv och sand	2 (± 0,5)
Kalciumkarbonat	$CaCO_3$, pulveriserat, kemiskt rent	0,05–0,1
Vatten	Konduktivitet ≤ 10 μS/m	30–50

Beredning

Torven lufttorkas och mals ner till ett fint pulver. En suspension av behövlig mängd torvpulver i avjoniserat vatten bereds med effektiv homogeniseringsapparat. Suspensionens pH justeras till 5,5 ± 0,5 med $CaCO_3$. Suspensionen konditioneras minst två dagar med skonsam omrörning vid 20 ± 2 °C, för att stabilisera pH och etablera en stabil mikrobiell komponent, varefter pH uppmäts på nytt och bör vara 6,0 ± 0,5. Torvsuspensionen blandas sedan med de övriga beståndsdelarna (sand och kaolinlera) och avjoniserat vatten till ett homogent sediment med en vattenhalt som ger kring 30–50 procent torrvikt av sediment. Därefter mäts den slutliga blandningens pH på nytt och justeras vid behov till 6,5–7,5 med $CaCO_3$. Prover tas av sedimentet för att bestämma torrvikten och halten organiskt kol. Likaså rekommenderas att det syntetiska sediment som ska användas i ett chironomidtoxicitetstest konditioneras före användningen i sju dagar i samma betingelser som råder i det efterföljande testet.

Förvaring

De torra beståndsdelarna för beredning av syntetiskt sediment kan lagras i ett torrt och svalt utrymme vid rumstemperatur. Berett (vått) sediment ska inte lagras för användning i test. Det bör användas omedelbart efter den 7 dagar långa konditioneringsperioden i slutet av beredningen.

LITTERATUR:

Kapitel C.8 i denna bilaga, Toxicitet hos daggmaskar.

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, s. 10–20.

▼M4

Tillägg 4

Krav på kemiska egenskaper hos utspädningsvatten

Ämne	Koncentrationer
Partikelinnehåll	< 20 mg/l
Totalt organiskt kol	< 2 mg/l
Ojoniserad ammoniak	< 1 µg/l
Hårdhet som $CaCO_3$	< 400 mg/l (*)
Restklor	< 10 µg/l
Bekämpningsmedel med organiska fosforföreningar, totalt.	< 50 ng/l
Bekämpningsmedel med organiska klorföreningar plus polyklorerade bifenyler, totalt.	< 50 ng/l
Totalt organiskt klor	< 25 ng/l

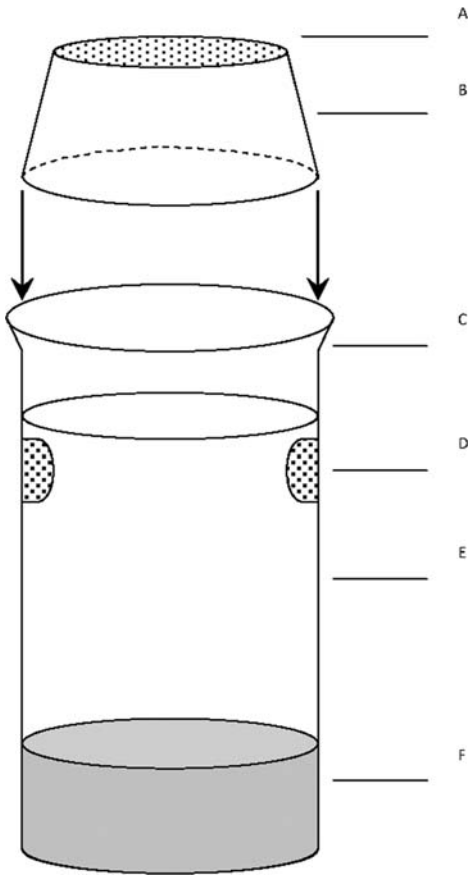
(*) Här bör noteras att om man misstänker växelverkan mellan hårdhetsjoner och testämnet, bör vatten med lägre hårdhet användas (och i en sådan situation får Elendt Medium M4 inte användas).

▼M4

Tillägg 5

Vägledning för övervakning av kläckning av chironomider

Fällor placeras på testbägarna. Dessa fällor behövs från dag 20 fram till testets slut. Exempel på en fälla visas nedan.



A: nylonnät

B: upp-och-nedvänd plastkopp

C: exponeringskärl utan läpp

D: filterportar för vattenutbyte

E: vatten

F: sediment

▼M4

C.29 LÄTT BIONEDBRYTBARHET – CO_2 I FÖRSLUTNA KÄRL (Headspace-test)

INLEDNING

1. Denna testmetod motsvarar OECD:s testriktlinje310 (2006). Denna testmetod är en screeningmetod för utvärdering av kemikaliers lättnedbrytbarhet och ger liknande information som de sex testmetoder som beskrivs i kapitel C.4 i denna bilaga A–F. En kemikalie som ger positiva testresultat med denna metod kan anses vara lätt bionedbrytbar och sönderfaller således snabbt i miljön.

2. Den väletablerade koldioxidmetoden (1) är baserad på Sturms ursprungliga test (2) för bestämning av organiska kemikaliers bionedbrytbarhet, genom mätning av koldioxid (CO_2) som produceras genom mikrobiell verksamhet, har i regel varit det första valet för testning av dåligt lösliga kemikalier och kemikalier med starkt adsorberande egenskaper. Testet väljs också för lösliga (men inte flyktiga) kemikalier, eftersom många anser att utveckling av koldioxid är det enda otvivelaktiga beviset på mikrobiell aktivitet. Avlägsnandet av upplöst organiskt kol kan påverkas av fysikalkemiska processer – adsorption, avdunstning, utfällning, hydrolys – såväl som av mikrobiell aktivitet och många icke-biologiska reaktioner som förbrukar syre; CO_2 produceras sällan från organiska kemikalier på abiotisk väg. I det ursprungliga och modifierade Sturmtestet (1) (2) avlägsnas CO_2 från vätskefasen till de absorberande kärlen genom s.k. sparging (luftbubblor får strömma genom vätskemediet för att avlägsna CO_2), medan Larsons version (3) (4) går ut på att överföra CO_2 från reaktionskärlet till absorberingsenheterna genom att låta CO_2-fri luft passera genom utrymmet ovanför vätskan samtidigt som testkärlet omskakas kontinuerligt. Omskakning av reaktionskärlet används endast i Larson-modifieringen, och omrörning anges endast för olösliga ämnen i ISO 9439 (5) och i den ursprungliga US-versionen (6), enligt vilka sparging rekommenderas hellre än ersättning av gasfasen. I en annan officiell US EPA-metod (8) baserad på Gledhill-metoden (8) hålls reaktionskärlet under omskakning och förseglat från atmosfären, och CO_2 som produceras samlas in i en intern alkalisk fälla direkt från gasfasen, på samma sätt som i klassiska Warburg/Barcroft-respirometerflaskor.

3. Det har dock visat sig att det för ett antal kemikalier ackumuleras oorganiskt kol i mediet vid användning av standard-Sturmtest i modifierad form (9). En koncentration på upp till 8 mg/l oorganiskt kol konstaterades under sönderfall av 20 mg C/l anilin. Uppsamling av CO_2 i alkaliska fällor gav således inte en äkta bild av mängden mikrobiologiskt producerad CO_2 vid mellanliggande tidpunkter under sönderfallet. Det medför att specifikationen om att minst 60 % av teoretisk maximal CO_2-produktion ($ThCO_2$) måste samlas upp inom ett tiodagarsfönster (de tio dagar som följer omedelbart efter att 10 % bionedbrytning har uppnåtts) för att en testkemikalie ska klassificeras som lätt bionedbrytbar, inte uppfylls för vissa kemikalier som skulle ges denna klassificering om man använder eliminering av upplöst organiskt kol (DOC).

4. Om procentandelen sönderdelning är lägre än förväntat, är det möjligt att oorganiskt kol har ackumulerats i testlösningen. Då kan nedbrytbarheten bedömas med andra test för biologisk nedbrytbarhet.

▼M4

5. De övriga nackdelarna med Sturmtest (besvärligt, tidskrävande, högre risk för experimentella fel och kan inte användas för flyktiga kemikalier) har tidigare lett till sökning efter en teknik med förslutet kärl, annan än Gledhill, hellre än gasgenomflöde (10) (11). Boatman m.fl. (12) granskade de tidigare metoderna och valde ett system med slutet utrymme ovan för vätskeytan där CO_2 frigjordes till detta utrymme i slutet av inkubationen genom försurning av mediet. CO_2 uppmättes med gaskromatografi (GC)/IC i automatiskt tagna prover i gasutrymmet, medan upplöst oorganiskt kol (DIC) i vätskefasen inte beaktades. Likaså var de kärl som användes mycket små (20 ml) med endast 10 ml medium, vilket orsakade problem t.ex. vid tillsättning av de mycket små mängderna av olösliga testkemikalier, och/eller eventuellt fanns det inte tillräckliga mängder eller inga mikroorganismer i det inokulerade mediet som kunde sönderbryta testkemikalierna.

6. Dessa svårigheter har lösts genom oberoende studier gjorda av Struijs och Stoltenkamp (13) samt av Birch och Fletcher (14), där de senare byggde på erfarenheter med apparatur använd i test för anaerob biologisk nedbrytning (15). I den tidigare metoden (13) mäts CO_2 i utrymmet ovanför vätskan efter försurning och jämvikt, medan den senare metoden (14) innebär att man mäter DIC i både gas- och vätskefaserna, utan behandling; över 90 % av bildat oorganiskt kol fanns i vätskefasen. Båda metoderna har fördelar jämfört med Sturmtest, i den meningen att testsystemet är mera kompakt och lätthanterligt, flyktiga kemikalier kan testas och man undviker risken för fördröjning vid mätning av producerad CO_2.

7. De två principerna kombinerades i ISO Headspace CO_2 Standard (16) som ringtestades (17) och denna standard utgör grunden för den testmetod som beskrivs här. De två principerna har också använts i US EPA-metoden (18). Två metoder för mätning av CO_2 har rekommenderats – CO_2 i utrymmet ovanför vätskan (headspace) efter försurning (13) och oorganiskt kol i vätskefasen efter tillförsel av överskottsalkali. Den senare metoden infördes av Peterson under CONCAWE-ringtestet (19) av denna headspace-metod som modifierats till att mäta lätt biologisk nedbrytbarhet. De ändringar som gjordes vid 1992 års revidering (20) av metoden i kapitel C.4 i denna bilaga om lätt bionedbrytbarhet har införlivats i denna testmetod, så att betingelserna (medium, tidslängd osv.) för övrigt är desamma som betingelserna i det reviderade Sturmtestet (20). Birch och Fletcher (14) har visat att de resultat som erhölls med detta headspace-test är mycket lika de resultat som erhölls med samma kemikalier i OECD-ringtest (21) av de reviderade testmetoderna.

PRINCIP FÖR TESTMETODEN

8. Testkemikalien, i regel 20 mg C/l, såsom enda källa för kol och energi, inkuberas i ett buffert-mineralsaltmedium som har inokulerats med en blandad population mikroorganismer. Testet genomförs i förslutna flaskor med ett luftutrymme ovanför vätskan som syrekälla för aerob biologisk nedbrytning. Utvecklingen av CO_2 till följd av fullständig aerob biologisk nedbrytning av testkemikalien bestäms genom att mäta den mängd oorganiskt kol som produceras i testflaskorna utöver den mängd som produceras i kontrollkärl för bakgrundsvärde som endast innehåller inokulerat medium. Graden av biologisk nedbrytning uttrycks som en procentandel av den teoretiska maximiproduktionen av oorganiskt kol (ThIC), jämfört med den mängd testkemikalie (i form av organiskt kol) som tillfördes i början.

9. DOC-elimineringen och/eller graden av primär biologisk nedbrytning av testkemikalien kan också mätas (20).

▼M4

INFORMATION OM TESTKEMIKALIEN

10. Testkemikaliens halt av organiskt kol (viktprocent) måste vara känd, antingen på grundval av den kemiska strukturen eller genom mätning, så att den procentuella nedbrytningen kan beräknas. För flyktiga testkemikalier kan uppmätt eller beräknad Henrys lags konstant användas för beräkning av lämplig kvot mellan utrymmet ovanför vätskan och vätskevolymen. Information om testkemikaliens toxicitet för mikroorganismer kan användas för att välja en lämplig testkoncentration och för tolkning av resultat som tyder på dålig biologisk nedbrytbarhet – inhibitionskontroll rekommenderas om det inte är känt att testkemikalien inte inhiberar mikrobiella aktiviteter (se punkt 24).

METODENS LÄMPLIGHET

11. Testmetoden kan användas för vattenlösliga och olösliga testkemikalier; god dispergering av testkemikalien bör säkerställas. Med användning av den rekommenderade kvoten på 1:2 mellan utrymmet ovanför vätskan och vätskevolymen kan flyktiga kemikalier med en Henrys lags konstant upp till 50 Pa m^3 mol^{-1} testas eftersom andelen testkemikalie i utrymmet ovanför vätskan inte överskrider 1 % (13). Ett mindre utrymme ovanför vätskan kan användas vid testning av kemikalier som är flyktigare, men deras biotillgänglighet kan utgöra en begränsning, särskilt om de har dålig löslighet i vatten. Man bör dock se till att kvoten mellan utrymmet ovanför vätskan och vätskevolymen samt testkemikaliens koncentration ger tillgång till tillräckligt med syre för att fullständig aerob bionedbrytning ska kunna ske (t.ex. genom att undvika en hög substratkoncentration och för liten volym ovanför vätskan). Vägledning om detta finns i (13) och (23).

REFERENSKEMIKALIER

12. I syfte att kontrollera testförfarandet bör en testkemikalie med känd biologisk nedbrytbarhet testas parallellt. För detta ändamål kan anilin, natriumbensoat eller etylenglykol användas vid testning av vattenlösliga testkemikalier och 1-oktanol för testkemikalier med dålig löslighet. Referenskemikaliernas biologiska nedbrytbarhet bör nå upp till mer än 60 % av ThIC inom 14 dagar.

REPRODUCERBARHET

13. Vid ISO-ringtest av metoden (17) erhölls följande resultat i rekommenderade betingelser, i vilket ingick 20 mg C testkemikalie/l.

Testkemikalie	Medelvärde för procentuell biologisk nedbrytning (28 d)	Variationskoefficient (%)	Antal laboratorier
Anilin	90	16	17
1-oktanol	85	12	14

Variationen mellan tester (replikerbarhet) med användning av anilin var låg, med variationskoefficienter under 5 % för de flesta testningskörningar. I de två fall där replikerbarheten var sämre berodde den större variationen sannolikt på hög produktion av oorganiskt kol i kontrollkärlen för bakgrundsvärde. Replikerbarheten var sämre med 1-oktanol men var fortfarande lägre än 10 % för 79 % av testkörningarna. Denna större variation mellan tester kan ha berott på doseringsfel, eftersom en liten volym (3–4 μl) 1-oktanol måste injiceras i de förslutna testflaskorna. Variationskoefficienterna kan bli högre när lägre koncentrationer av testkemikalie används, särskilt vid koncentrationer under 10 mg C/l. Detta kan delvis lösas genom att sänka koncentrationen totalt oorganiskt kol (TIC) i inokulatet.

▼M4

14. I ett EU-ringtest (24) med fem ytaktiva ämnen tillsatta såsom 10 mg C/l erhölls följande testresultat:

Testkemikalie	Medelvärde för procentuell biologisk nedbrytning (28 d)	Variationskoefficient (%)	Antal laboratorier
Tetrapropylen Bensensulfonat	17	45	10
Di-iso-oktylsulfo-succinat (anioniskt)	72	22	9
Hexadekyl-trimetyl (*) Ammoniumklorid (katjonisk)	75	13	10
Iso-nonylfenol-(etoxylat)$_9$ (icke-joniskt)	41	32	10
Cocoamidopropylbetain (amfoteriskt)	60	23	11

(*) SiO_2 tillsattes för att neutralisera toxicitet.

Resultaten tyder på att variationen allmänt taget var högre för de ytaktiva ämnen som hade sämre nedbrytning. Variationen mellan tester var mindre än 15 % för över 90 % av fallen, och den högsta variationen var 30–40 %.

ANMÄRKNING: De flesta ytaktiva ämnen har inte enhetlig molekylär struktur utan är blandningar av isomerer, homologer osv. som sönderfaller efter olika långa lagfaser och med olika kinetiska hastigheter, vilket resulterar i lägre kurvor, dvs. gränsvärdet på 60 % kanske inte nås inom tiodagarsfönstret, även om varje enskild molekylär enhet skulle nå detta värde vid testning för sig. Detta kan även observeras med andra komplexa blandningar.

METODBESKRIVNING

Apparatur

15. Normal laboratorieapparatur och följande:

a) Glasserumflaskor, förseglade med butylgummiproppar och kapsyllock av aluminium. Rekommenderad storlek är ”125 ml” som har en total volym på cirka 160 ml (i detta fall bör man försäkra sig om att volymen för var och en flaska är 160 ±1 ml. Mindre kärl kan användas om resultaten uppfyller de villkor som beskrivs i punkterna 66 och 67.

b) Kolanalysator eller annat instrument (t.ex. gaskromatograf) för mätning av oorganiskt kol.

▼M4

c) Högprecisionssprutor för gas- och vätskeformiga prover.

d) Orbitalt skakbord i temperaturkontrollerad omgivning.

e) Tillförsel av CO_2-fri luft – kan ordnas genom att låta luft flöda genom kalk-soda-granulat eller genom att använda en gasblandning av 80 % N_2 och 20 % O_2 (frivilligt) (se punkt 28).

f) Membranfiltreringsutrustning med 0,20–0,45 μm porstorlek (frivilligt).

g) Analysutrustning för organiskt kol (frivilligt).

Reagenser

16. Alla reagenser som används ska vara av analytisk renhetsgrad.

Vatten

17. Destillerat eller avjoniserat vatten ska användas med ≤ 1 mg/l som totalt organiskt kol. Detta representerar ≤ 5 % av det ursprungliga organiska kol som tillförs genom den rekommenderade dosen testkemikalie.

Stamlösningar av mineralsaltmediet

18. Stamlösningar och mineralsaltmedium liknande de i testerna ISO 14593 (16) och C.4 för lätt biologisk nedbrytbarhet (20) ska användas. En högre koncentration av ammoniumklorid (2,0 g/l i stället för 0,5 g/l) är endast nödvändigt i särskilda undantagsfall, t.ex. när koncentrationen testkemikalie överstiger 40 mg C/l. Stamlösningarna bör förvaras i kylskåp och slängas efter sex månader, eller tidigare om det finns tecken på fällning eller mikrobiell tillväxt. Följande stamlösningar ska beredas:

a) Kaliumdivätefosfat (KH_2PO_4) 8,50 g

Dikaliumvätefosfat (K_2HPO_4) 21,75 g

Dinatriumvätefosfatdihydrat ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$) 33,40 g

Ammoniumklorid (NH_4Cl) 0,50 g

Lös upp i vatten och fyll upp till 1 liter. Lösningens pH bör vara 7,4 (± 0,2). Om inte, bered en ny lösning.

b) Kalciumkloriddihydrat ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$) 36,40 g

Lös upp i vatten och fyll upp till 1 liter.

c) Magnesiumsulfatheptahydrat ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) 22,50 g

Lös upp i vatten och fyll upp till 1 liter.

d) Järn(III)kloridhexahydrat ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$) 0,25 g

Lös upp i vatten och fyll upp till 1 liter och tillsätt en droppe koncentrerad väteklorid.

Beredning av mineralmedium

19. Blanda 10 ml av lösning a med cirka 800 ml vatten (punkt 17), tillsätt 1 ml av lösningarna b, c och d och fyll upp till 1 liter med vatten (punkt 17).

Övriga reagenser

20. Koncentrerad ortofosforsyra (H_3PO_4) (> 85 % massa per volym).

▼M4

Natriumhydroxidlösning 7 M

21. Lös upp 280 g natriumhydroxid (NaOH) i 1 liter vatten (punkt 17). Bestäm DIC-koncentrationen i denna lösning och beakta värdet vid beräkning av testresultaten (se punkterna 55 och 61), särskilt med tanke på giltighetskriteriet enligt punkt 66 b. Bered en ny, färsk lösning om koncentrationen DIC är för hög.

Testkemikalie

22. Bered en stamlösning av en tillräckligt vattenlöslig kemikalie i vatten (punkt 17) eller i testmedium (punkt 19) i en koncentration som helst är 100-faldig jämförd med den koncentration som ska användas i testet; det kan vara nödvändigt att justera stamlösningens pH. Stamlösning tillförs mineralmediet så att den slutliga halten av organiskt kol blir mellan 2 och 40 mg C/l, helst 20 mg C/l. Om lägre koncentrationer används kan precisionen bli lidande. Lösliga och olösliga vätskeformiga kemikalier kan tillsättas i kärlen direkt med hjälp av högprecisionssprutor. För dåligt lösliga och olösliga testkemikalier kan det krävas specialbehandling (25). Det finns följande alternativ:

a) Direkt tillsättning av kända vägda mängder.

b) Dispergering med ultraljud före tillsättning.

c) Dispergering med hjälp av emulgeringsmedel som krävs för att fastställa huruvida de har inhiberande eller stimulerande effekter på den mikrobiella aktiviteten före tillsättning.

d) Adsorption av vätskeformig testkemikalie eller lösning i ett lämpligt flyktigt lösningsmedel, på ett annat medium eller underlag (t.ex. glasfiberfilter), och därefter avdunstning av lösningsmedlet om sådant använts och direkt tillsättning av kända mängder.

e) Tillsättning av känd mängd av en lösning av testkemikalien i ett lättflyktigt lösningsmedel i ett tomt testkärl, och därefter avdunstning av lösningsmedlet.

Medel eller lösningsmedel som används i c, d och e måste ha testats för stimulerande eller inhiberande effekt på mikrobiell aktivitet (se punkt 42 b).

Referenskemikalie

23. Bered en stamlösning av (löslig) testkemikalie i vatten (punkt 17) i en koncentration som helst är 100-faldig i jämförelse med den slutliga koncentration som ska användas (20 mg C/l) i testet.

Inhibitionskontroll

24. Det händer ofta att testkemikalier inte uppvisar någon betydande nedbrytning under de betingelser som används för bedömning av lätt bionedbrytbarhet. En tänkbar orsak är att testkemikalien fungerar inhiberande på inokulatet vid den koncentration som används i testet. Inhibitionskontroll kan införlivas i testutformningen för att göra det möjligt att (i efterhand) identifiera inhibering som en möjlig orsak eller bidragande faktor. Alternativt kan man med hjälp av inhibitionskontrollen utesluta sådana störningar och påvisa att ingen eller svag nedbrytning endast beror på motstånd mot mikrobiell attack i testbetingelserna. För att få information om testkemikaliens toxicitet för (aeroba) mikroorganismer) bereds en lösning i testmediet med testkemikalien och referenskemikalien (punkt 19), var och en i samma koncentration som tillsatt koncentration (se punkterna 22 och 23).

▼M4

Inokulat

25. Inokulatet kan härröra från ett flertal källor: aktiverat slam, avloppsvatten (oklorerat), ytvatten och jordar eller från en blandning av dessa (20). Källans bionedbrytningsaktivitet bör kontrolleras med hjälp av en referenskemikalie. Oavsett källa bör mikroorganismer som tidigare exponerats för testkemikalien inte användas om förfarandet är avsett att användas som ett test för lätt bionedbrytbarhet.

Varning: Aktiverat slam, avlopp och avloppsutflöde innehåller patogena organismer och måste hanteras försiktigt.

26. Erfarenheter har visat att den optimala volymen för inokulat är en volym som

— är tillräcklig för att ge en tillbörlig bionedbrytningsaktivitet,

— ger tillräcklig nedbrytning av referenskemikalien (se punkt 66),

— ger 10^2 till 10^5 kolonibildande enheter per milliliter i den slutliga blandningen,

— i regel ger en koncentration på 4 mg/l suspenderade fasta ämnen i den slutliga blandningen när aktiverat slam används; koncentrationer upp till 30 mg/l kan användas men då uppstår betydlig ökning av CO_2-produktionen i kontrollkärlen för bakgrundsvärde (26),

— bidrar till mindre än 10 % av ursprungskoncentrationen av organiskt kol som tillförs genom testkemikalien,

— i regel är 1–10 ml inokulat per 1 liter testlösning.

Aktiverat slam

27. Aktiverat slam tas i färsk form från luftningstanken i ett reningsverk eller en enhet i laboratorieskala som i huvudsak behandlar avlopp från hushåll. Vid behov kan grova partiklar avlägsnas genom sållning (t.ex. 1 mm^2) och slammet bör hållas aerobt fram till att det används.

28. Alternativt kan slammet efter eliminering av grova partiklar få sedimentera eller slammet centrifugeras (t.ex. 1 100 × g i 10 minuter). Avlägsna supernatantvätskan. Slammet kan tvättas i minerallösningen. Det koncentrerade slammet suspenderas i mineralmediet till en koncentration på 3–5 g suspenderade fasta ämnen per liter. Detta hålls under luftning tills att det används.

29. Slammet bör tas från ett effektivt fungerande konventionellt reningsverk. Om slam måste tas från ett high rate-reningsverk (högre belastningsgrad och kortare retentionstider) eller kan förmodas innehålla inhibitorer, bör det tvättas. Sedimentera eller centrifugera det återsuspenderade slammet efter grundlig blandning, avlägsna överstående vätska och suspendera tvättat slam på nytt i en ny volym av mineralmedium. Upprepa förfarandet tills att slammet anses vara fritt från överflödigt substrat eller inhibitor.

30. Efter fullständig återsuspension eller, om det gäller obehandlat slam, ta ett prov strax före användning för bestämning av torrvikten för suspenderade fasta ämnen.

31. Ett annat alternativ är att homogenisera aktiverat slam (3–5 g suspenderade fasta ämnen/l). Behandla slammet i en Waring-blandare i 2 minuter på medelhastighet. Låt det blandade slammet sätta sig i 30 minuter eller vid behov längre och dekantera vätskan för användning som inokulat (cirka 10 mg/l mineralmedium).

▼M4

32. Ytterligare minskning av CO_2-utveckling i kontrollprovet för bakgrundsvärde kan fås genom att lufta slammet över natten med CO_2-fri luft. Använd 4 mg/l fasta ämnen från aktiverat slam som koncentration för inokulatet i detta test (13).

Sekundärt avloppsutflöde

33. Alternativt kan inokulat tas från sekundärt utflöde från ett reningsverk eller en enhet i laboratorieskala som i huvudsak tar emot avloppsvatten från hushåll. Håll provet under aeroba förhållanden och använd det samma dag som det tagits eller gör vid behov förkonditionering. Utflödet filtreras genom ett grovfilter för att avlägsna stora partiklar och därefter mäts pH.

34. För att minska halten oorganiskt kol gör sparging av filtratet med CO_2-fri luft (punkt 15 e) i 1 timme medan pH hålls på 6,5 med hjälp av ortofosforsyra (punkt 20). Därefter återställs pH-värdet till det ursprungliga med natriumhydroxid (punkt 21) och efter sedimentering cirka 1 timme tas en lämplig volym av supernatanten för inokulering. Genom sparging reduceras inokulatets halt av oorganiskt kol. Om t.ex. den maximala rekommenderade volymen av filtrerat utflöde som genomgått sparging (100 ml) per liter vatten använts som inokulat, är mängden oorganiskt kol i kontrollkärlen för bakgrundsvärde mellan 0,4 till 1,3 mg/l (14), vilket representerar 2–6,5 % av testkemikaliens kol vid 20 mg C/l och 4–13 % vid 10 mg C/l.

Ytvatten

35. Ett prov tas av lämpligt ytvatten. Provet bör hållas i aeroba förhållanden och användas samma dag som det tas. Vid behov bör provet koncentreras genom filtrering eller centrifugering. Den volym inokulat som används i vart och ett testkärl bör bestämmas enligt kriterierna i punkt 26.

Jordar

36. Ett prov tas av lämplig jord på ned till 20 cm djup från jordytan. Stenar, växtrester och invertebrater bör avlägsnas från jordprovet innan det sållas genom 2 mm maskor (vid behov kan provet torkas lite om det är för vått för sållning). Provet bör hållas under aeroba förhållanden och användas samma dag som det tas (om provet transporteras i en löst sluten polyetenpåse kan det förvaras vid 2–4 °C upp till en månad).

Förkonditionering av inokulat

37. Inokulatet kan förkonditioneras för försöksförhållandena men får inte föranpassas till testkemikalien. Genom förkonditionering kan man minska bakgrundsutveckling av CO_2 i kontrollkärlen. Förkonditionering innebär att aktiverat slam luftas efter utspädning i testmediet till 30 mg/l med fuktig CO_2-fri luft upp till 5–7 dagar vid testtemperatur.

TESTFÖRFARANDE

Antal flaskor

38. Antalet flaskor (se punkt 15 a) som behövs för ett test beror på analysfrekvensen och testets tidslängd.

39. Det rekommenderas att ett triplikat flaskor analyseras efter ett tillräckligt antal tidsintervall så att tiodagarsfönstret kan fastställas. Minst fem testflaskor (se punkt 15 a) från uppsättningarna a, b och c (se punkt 42) analyseras i slutet av testet, som grund för beräkning av 95 %-konfidensintervall för den genomsnittliga procentuella biologiska nedbrytningen.

▼M4

Inokulerat medium

40. Inokulatet används vid en koncentration på 4 mg/l aktiverat slam räknat som torrvikt. Bered omedelbart före användning tillräcklig mängd inokulerat medium genom tillsättning av t.ex. 2 ml lämpligt behandlat aktiverat slam (se punkterna 27–32) med 2 000 mg/l till 1 liter mineralsaltmedium (se punkt 19). När sekundärt avloppsutflöde ska användas, tillsätt upp till 100 ml utflöde (se punkt 33) till 900 ml mineralsaltmedium (se punkt 19) och späd till 1 liter med medium.

Beredning av flaskor

41. Alikvoter av inokulerat medium doseras till replikatflaskor så att kvoten mellan ovanförliggande utrymme och vatten är 1:2 (tillsätt t.ex. 107 ml till flaskor med 160 ml kapacitet). Andra kvoter kan användas, men se varningarna i punkt 11. Oavsett vilken typ av inokulat som används är det viktigt att se till att det inokulerade mediet blandas tillräckligt för att säkerställa enhetlig fördelning i testflaskorna.

42. Flaskuppsättningarna (punkt 15 a) bereds enligt följande:

a) Testkärl (betecknade F_T) som innehåller testkemikalie.

b) Kontrollkärl för bakgrundsvärde (betecknade F_B) som endast innehåller testmedium plus inokulat; likaså måste alla eventuella kemikalier, lösningsmedel, agenter eller glasfiberfilter som används för att införa testkemikalien i testkärlen tillsättas.

c) Kärl (betecknade F_C) för kontroll av förfarandet med referenskemikalien.

d) Vid behov, kärl (betecknade F_I) för kontroll av eventuell inhiberande effekt från testkemikalien som innehåller både testkemikalie och referenskemikalie vid samma koncentrationer (punkt 24) som i flaskorna F_T och F_C.

e) Kärl (betecknade F_S) för kontroll av eventuell abiotisk sönderdelning som i led a plus 50 mg/l $HgCl_2$ eller steriliserade på annat sätt (t.ex. i autoklav).

43. Vattenlösliga testkemikalier och referenskemikalier tillsätts som vattenbaserade stamlösningar (punkterna 22, 23 och 24) så att koncentrationer på 10–20 mg C/l erhålls.

44. Olösliga testkemikalier och olösliga referenskemikalier tillsätts flaskorna på olika sätt (se punkt 22 a–e) beroende på testkemikaliens natur, antingen före eller efter tillsättning av inokulerat medium, beroende på metoden för behandling av testkemikalien. Om något av de förfaranden som anges i punkt 22 a–e används ska kontrollflaskorna för bakgrundsvärde F_B (punkt 42 b) behandlas på samma sätt, men testkemikalien och referenskemikalien utesluts.

45. Flyktiga testkemikalier ska injiceras i förslutna flaskor (punkt 47) med användning av mikrospruta. Dosen beräknas utifrån injicerad volym och testkemikaliens densitet.

46. Vid behov bör vatten tillsättas, för att få samma vätskevolym i varje kärl. Det är viktigt att se till att kvoten mellan utrymmet ovanför vätskan och vätska (i regel 1:2) och koncentrationen testkemikalie är sådana att det finns tillräckligt med syre i utrymmet ovanför vätskan för fullständig biologisk nedbrytning.

▼M4

47. Därefter förseglas alla flaskor med t.ex. butylgummipropp (septum) och kapsyllock av aluminium. Om flyktiga kemikalier testas, tillsätts de i detta skede (punkt 45). Om övervakning ska göras av DOC-koncentrationsminskningen i testlösning och tidpunkt noll-analyser göras för ursprunglig koncentration av oorganiskt kol (sterila kontroller, punkt 43 e) eller andra determinanter, tas ett lämpligt prov från testkärlet. Därefter slängs testkärlet och dess innehåll.

48. De förslutna flaskorna placeras på ett roterande skakbord (punkt 15 d) där skakhastigheten är tillräcklig för att hålla flaskornas innehåll väl blandat och suspenderat (t.ex. 150–200 rpm), och inkuberas i mörker vid 20 °C som bör hållas inom ± 1 °C.

Provtagning

49. Provtagningsschemat beror på lagperioden och den kinetiska hastigheten för testkemikaliens biologiska nedbrytning. Flaskorna tas för analys på provtagningsdagen, och provtagning bör göras minst varje vecka eller oftare (t.ex. två gånger i veckan) om en fullständig nedbrytningskurva önskas. Behövligt antal replikatflaskor tas från skakbordet så att F_T, F_B och F_C representeras, och, i förekommande fall F_I och F_S (se punkt 42). Testperioden är normalt 28 dagar. Om bionedbrytningskurvan tyder på att platåfasen har nåtts tidigare än efter 28 dagar, kan testet avslutas tidigare. Ta prover från de fem flaskor som reserverats för testdag 28 för analys, och använd resultaten för att beräkna konfidensintervall eller variationskoefficient för procentandelen biologisk nedbrytning. Provtagning från flaskor som representerar kontrollerna av inhibering och abiotisk nedbrytning behöver inte göras lika ofta som för de övriga flaskorna – dag 1 och dag 28 är tillräckligt.

Analys av oorganiskt kol

50. CO_2-produktionen i flaskorna bestäms genom att mäta ökningen av koncentrationen oorganiskt kol under inkubationen. Det finns två metoder som rekommenderas för mätning av mängden oorganiskt kol som produceras under testet; dessa beskrivs nedan. Eftersom metoderna kan ge något avvikande resultat, bör endast en av metoderna användas vid en testkörning.

51. Metod a rekommenderas om mediet sannolikt innehåller rester av t.ex. glasfilterpapper och/eller olöslig testkemikalie. Analysen kan göras med gaskromatograf om kolanalysator inte finns att tillgå. Det är viktigt att flaskorna har testtemperatur eller nära testtemperatur när gasen i utrymmet ovanför vätskan analyseras. Metod b kan vara enklare för laboratorier som använder kolanalysatorer för att mäta oorganiskt kol. Det är viktigt att natriumhydroxidlösningen (punkt 21) som används för att omvandla CO_2 till karbonat är antingen nyberedd eller att lösningens halt av oorganiskt kol är känd, så att detta kan beaktas vid beräkning av testresultaten (se punkt 66 b).

Metod a: försurning till pH < 3

52. Före varje analyssats ska analysatorn av oorganiskt kol kalibreras med hjälp av en lämplig standard (t.ex. 1 % w/w CO_2 i N_2). Koncentrerad ortofosforsyra (punkt 20) injiceras genom varje provtagningsflaskas gummipropp för att sänka mediets pH till < 3 (tillsätt t.ex. 1 ml till 107 ml testmedium). Flaskorna sätts tillbaka på skakbordet. Efter en timme på skakbordet i testtemperatur avlägsnas flaskorna, alikvoter (t.ex. 1 ml) av gas dras ur utrymmet ovanför vätskan i varje flaska och injiceras i analysatorn för oorganiskt kol. De uppmätta koncentrationerna oorganiskt kol registreras som mg C/l.

▼M4

53. Principen med denna metod är att efter försurning till pH < 3 och stabilisering vid 20 °C, få en jämviktskonstant för fördelningen av CO_2 mellan vätske- och gasfaserna i testflaskorna som är 1,0 när den uppmäts som en koncentration (13). Detta bör demonstreras för testsystemet minst en gång, enligt följande:

Lägg upp flaskor som innehåller 5 och 10 mg/l oorganiskt kol med användning av vattenfritt natriumkarbonat (Na_2CO_3) i CO_2-fritt vatten som beretts genom försurning av vatten till pH 6,5 med koncentrerad ortofosforsyra (punkt 20), med sparging över natten med CO_2-fri luft och därefter höjning av pH till neutralt med alkali. Se till att kvoten mellan utrymmet ovanför vätskan och vätskans volym är samma som vid testningen (t.ex. 1:2). Försura och stabilisera till jämvikt enligt beskrivningen i punkt 52 och mät koncentrationerna av oorganiskt kol i både gas- och vätskefasen. Kontrollera att båda koncentrationerna är desamma inom gränserna för försöksfel. Om de inte är det, bör förfarandena ses över. Denna kontroll av fördelningen av oorganiskt kol mellan vätske- och gasfasen behöver inte göras varje gång testet utförs, men kan rutinmässigt göras när kalibrering utförs.

54. Om DOC-eliminering ska mätas (endast vattenlösliga testkemikalier) bör proverna tas från vätskefasen i separata (icke-försurade) flaskor, membranfiltreras och injiceras i DOC-analysatorn. Dessa flaskor kan enligt behov användas för andra analyser för mätning av primär bionedbrytning.

Metod b: omvandling av CO_2 till karbonat

55. Före varje analyssats ska analysatorn för oorganiskt kol kalibreras med hjälp av lämplig standard, t.ex. en lösning av natriumbikarbonat ($NaHCO_3$) i CO_2-fritt vatten (se punkt 53) inom området 0–20 mg/l räknat som oorganiskt kol. Natriumhydroxidlösning (7 M, punkt 21) (t.ex. 1 ml till 107 ml medium) injiceras genom varje provtagningsflaskas gummipropp och flaskorna skakas i en timme vid testtemperaturen. Använd samma NaOH-lösning för alla flaskor som tas till provtagning på en viss dag, men inte nödvändigtvis för alla provtagningar under hela testets gång. Om absoluta bakgrundsvärden för oorganiskt kol krävs vid alla provtagningar, måste bestämning av oorganiskt kol göras för NaOH-lösningen varje gång den används. Flaskorna tas ur skakbordet och innehållet får sätta sig. Lämpliga volymer (t.ex. 50–1 000 µl) av vätskefasen i varje kärl dras ut med injektionsspruta. Proverna injiceras i analysatorn för oorganiskt kol och koncentrationerna registreras. Man bör se till att analysatorn är tillbörligt utrustad för att tåla de alkaliska prover som analyseras i denna metod.

56. Principen med metoden är att efter tillsättning av alkali och omskakning, ska koncentrationen av oorganiskt kol i utrymmet ovanför vätskan vara negligerbar. Detta bör kontrolleras för testsystemet minst en gång med användning av standarder för oorganiskt kol, tillsats av alkali, jämviktsstabilisering och mätning av koncentrationen oorganiskt kol både i gas- och vätskefasen (se punkt 53). Koncentrationen i gasfasen bör närma sig noll. Denna kontroll av virtuell fullständig absorption av CO_2 behöver inte göras varje gång testet utförs.

57. Om DOC-eliminering ska mätas (endast vattenlösliga testkemikalier) bör proverna tas från vätskefasen i separata flaskor (som inte innehåller tillsatt alkali), membranfiltreras och injiceras i DOC-analysatorn. Dessa flaskor kan enligt behov användas för andra analyser för mätning av primär bionedbrytning.

▼M4

DATA OCH RAPPORTERING

Beräkning av resultaten

58. Utifrån ett antagande om 100 % mineralisering av testkemikalie till CO_2, motsvarar det ThIC utöver det som produceras i kontrollkärlen för bakgrundsvärde det TOC som tillfördes till varje testkärl i testets början, vilket betyder att

$$ThIC = TOC$$

Totalmassan (mg) oorganiskt kol (TIC) i varje flaska är då

$$TIC = (\text{mg C i vätskan} + \text{mg C i gasfasen}) = (V_L \times C_L) + (V_H \times C_H) \qquad \text{Ekvation 1}$$

där:

V_L = volymen vätska i flaskan (liter),

C_L = koncentrationen oorganiskt kol i vätskan (mg/l räknat som kol),

V_H = gasfasens volym (liter),

C_H = koncentrationen oorganiskt kol i gasfasen (mg/l räknat som kol).

Beräkningarna av totalt oorganiskt kol för de två analysmetoderna som används för mätning av oorganiskt kol i detta test beskrivs nedan i punkterna 60 och 61. Den procentuella bionedbrytningen (% D) i vart och ett fall fås genom följande:

$$\%D = \frac{(TIC_t - TIC_b)}{TOC} \times 100 \qquad \text{Ekvation 2}$$

där:

TIC_t = mg TIC i testflaskan vid tidpunkten t,

TIC_b = genomsnitt för mg TIC i kontrollflaskorna för bakgrundsvärde vid tidpunkten t,

TOC = mg TOC som i början tillfördes testkärlet.

Den procentuella andelen biologisk nedbrytning % D beräknas för flaskorna för test (F_T), referens (F_C) och, om inhibitionsövervakning görs, övervakning (F_I) utifrån de respektive mängder TIC som producerats fram till varje provtagningstidpunkt.

59. Om det har förekommit en betydande ökning av TIC i de sterila kontrollerna (F_S) över testperioden, kan man sannolikt sluta sig till att det har förekommit abiotisk nedbrytning av testkemikalien, och detta måste beaktas vid beräkning av D i ekvation 2.

Försurning till pH < 3

60. Eftersom försurning till pH < 3 och balansering till jämvikt leder till utjämning av TIC-koncentrationen i vätske- och gasfaserna, behöver endast IC-koncentrationen i gasfasen mätas. Från ekvation 1 fås således $TIC = (V_L + V_H) \times C_H = V_B \times C_H$, där V_B = serumflaskans volym.

Omvandling av CO_2 till karbonat

61. I denna metod görs beräkningarna såsom i ekvation 1, men den negligerbara mängden IC i gasfasen ignoreras, dvs. $V_H \times C_H = 0$ och $TIC = V_L \times C_L$.

▼M4

Presentation av resultaten

62. En bionedbrytningskurva fås genom att plotta den procentuella biologiska nedbrytningen D mot inkubationstiden och, om möjligt, lagfasen, bionedbrytningsfasen, tiodagarsfönstret och platåfasen (den fas då maximal nedbrytning har uppnåtts och bionedbrytningskurvan fasar ut). Om det finns jämförbara resultat för parallella testkärl F_T (< 20 % skillnad), plottas en genomsnittskurva (se figur 1 i tillägg 2), och om inte, plottas kurvor för varje kärl. Genomsnittsvärdet för den procentuella bionedbrytningen i platåfasen bestäms eller det högsta värdet uppskattas (t.ex. när kurvan går nedåt i platåfasen), men i det senare fallet bör man se upp att det inte handlar om ett utomliggande värde. Ange i testrapporten den maximala nivån av biologisk nedbrytning såsom testkemikaliens grad av bionedbrytning. Om antalet testkärl inte varit tillräckligt för att platåfasen ska framgå, används uppmätta data under testets sista dag för att beräkna ett medelvärde. Detta sista värde, medelvärdet av fem replikat, indikerar den precision med vilken den procentuella biologiska nedbrytningen bestämts. Rapportera också det värde som erhölls i slutet av tiodagarsfönstret.

63. Plotta på samma sätt en kurva för referenskemikalien F_C och, i förekommande fall, för den abiotiska elimineringskontrollen F_S och inhiberingskontrollen F_I.

64. Mängderna TIC i kontrollkärlen (F_B) registreras, liksom mängderna i flaskorna F_S (abiotisk kontroll), om dessa kärl har ingått i testet.

65. Beräkna D för F_I-kärlen, på grundval av teoretiskt IC-värde uppskattat endast från blandningens referenskomponent. Om på dag 28 $[(D_{FC}\,(^1) - D_{FI}\,(^2))/D_{FC}] \times 100 > 25$ %, kan man anta att testkemikalien har inhiberat inokulatets aktivitet och detta kan vara orsaken till lägre värden på D_{FT} som erhållits under testbetingelserna. Då måste testet upprepas med en lägre testkoncentration och helst även med mindre DIC i inokulatet och TIC som bildas i kontrollkärlen, eftersom den lägre koncentrationen annars minskar metodens precision. Alternativt kan ett annat inokulat användas. Om det i flaskorna F_S (abiotiska) observeras en betydande ökning (> 10 %) av mängden TIC, kan abiotiska nedbrytningsprocesser ha inträffat.

Resultatens giltighet

▼M7

66. Ett test anses vara giltigt om

a) den genomsnittliga procentuella nedbrytningen i FC-kärl (som innehåller referenskemikalie) är > 60 % senast den 14:e dagen efter inkubation, och

b) den genomsnittliga mängden TIC i kontrollkärlen FB i slutet av testet är < 3mg C/l.

Om dessa gränsvärden inte nås, måste testet upprepas med inokulat från en annan källa och/eller testförfarandena bör ses över. Om t.ex. en hög produktion av IC i kontrollkärlen är ett problem, bör förfarandet enligt punkterna 27–32 användas.

(1) Procentuell nedbrytning i F_C-kärl (som innehåller referensämne).
(2) Procentuell nedbrytning i F_I-kärl.

▼M4

67. Om testkemikalien inte når upp till 60 % ThIC och inte visat sig vara inhiberande (punkt 65) kan testet upprepas med ökad koncentration av inokulat (upp till 30 mg/l) aktiverat slam och 100 ml utflöde/l) eller inokulat från andra källor, särskilt om nedbrytningen har legat inom området 20–60 %.

Tolkning av resultaten

68. Biologisk nedbrytning > 60 % inom tiodagarsfönstret demonstrerar i detta test att testkemikalien är biologiskt lättnedbrytbar i aeroba betingelser.

69. Om gränsvärdet på 60 % ThIC inte uppnås, bestäm pH-värdet i mediet i flaskor som inte har försurats eller alkaliserats – ett värde lägre än 6,5 kan tyda på att nitrifikation har inträffat. Upprepa i så fall testet med en buffertlösning med högre koncentration.

Testrapport

70. Sammanställ en tabell med % D för varje flaska med testkemikalie (F_T), referenskemikalie (F_C) och, i förekommande fall, inhibitionskontroll (F_I) för varje provtagningsdag. Om jämförbara resultat erhålls för replikatflaskor, plotta en kurva med genomsnittet av % D mot tiden. Registrera mängden TIC i kontrollerna (F_B) och i de sterila kontrollerna (F_S) DOC och/eller andra determinanter och den procentuella elimineringen.

71. Bestäm genomsnittsvärdet för % D för platåfasen eller använd det högsta värdet om bionedbrytningskurvan går nedåt i platåfasen, och rapportera detta som graden bionedbrytning för testkemikalien. Det är viktigt att se till att i det senare fallet se till att det högsta värdet inte är ett utanförliggande värde.

72. Testrapporten ska innehålla följande information:

Testkemikalie:

— Trivialnamn, kemisk beteckning, CAS-nummer, strukturformel och relevanta fysikalkemiska egenskaper.

— Testkemikaliens renhet (orenheter).

Testbetingelser:

— Hänvisning till denna testmetod.

— Beskrivning av testsystemet (t.ex. kärlvolym, kvoten mellan volymen gasfas och volymen vätskefas, omrörningsmetod osv.).

— Applicering av testkemikalie och referenskemikalie till testsystemet, testkoncentration och mängd kol som doserats till var och en testflaska, eventuell användning av lösningsmedel.

— Uppgifter om inokulat, eventuell förbehandling och förkonditionering.

— Inkubationstemperatur.

— Validering av IC-analysens princip.

— Huvudegenskaper för IC-analysatorn (och alla andra analysmetoder som använts).

— Antalet replikat.

Resultat:

— Rådata och beräknade värden för biologisk nedbrytning i tabellform.

▼M4

— Kurva över procentuell nedbrytning av test- och referenskemikalierna mot tiden, lagfas, nedbrytningsfas, tiodagarsfönster och lutning.

— Procentandelen eliminering vid platåfasen, vid testets slut och efter tiodagarsfönstret.

— Motiveringar för eventuella förkastade testresultat

— Övriga fakta som är relevanta för de förfaranden som har använts.

— Diskussion om resultaten.

LITTERATUR

(1) Kapitel C.4 i denna bilaga, Bestämning av ”lätt” bionedbrytbarhet – CO_2-utveckling (metod C.4-C).

(2) Sturm R. N. (1973), ”Biodegradability of Nonionic surfactants: screening test for predicting rate and ultimate biodegradation”, *J.A,.Oil Chem Soc.* 50, s. 159–167.

(3) Larson R. J. (1979), ”Estimation of biodegradation potential of xenobiotic organic chemicals”, *Appl Env. Microbiol.* 38, s. 1153–1161.

(4) Larson R. J., Hansmann M. A. och Bookland E. A. (1996), ”Carbon dioxide recovery in ready biodegradability tests: mass transfer and kinetic constants”, *Chemosphere* 33, s. 1195–1210.

(5) ISO 9439 (1990; reviderad 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 of Prevention, Pesticides and Toxic Substances, Washington, DC.

(7) US EPA (1996), ”Fate, Transport and Transformation Test Guideline”, 835, 3100, ”Aerobic aquatic biodegradation”, Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances, Washington, DC.

(8) Gledhill W. E., (1975), ”Screening test for assessment of biodegradability: Linear alkyl benzene sulfonate”, *Appl Microbiol.* 30, s. 922–929.

(9) Weytjens D., Van Ginneken I. och Painter H. A. (1994), ”The recovery of carbon dioxide in the Sturm test for ready biodegradability”, *Chemosphere* 28, s. 801–812.

(10) Ennis D. M. och Kramer A. (1975), ”A rapid microtechnique for testing biodegradability of nylons and polyamides”, *J. Food Sci.* 40, s. 181–185.

(11) Ennis D. M., Kramer A., Jameson C. W., Mazzoccki P. H. och Bailey P. H. (1978), *Appl. Env. Microbiol.* 35, s. 51–53.

(12) Boatman R. J., Cunningham S. L. och Ziegler D. A. (1986), ”A method for measuring the biodegradation of organic chemicals”, *Env. Toxicol. Chem.* 5, s. 233–243.

(13) Struijs J. och Stoltenkamp J. (1990), ”Head space determination of evolved carbon dioxide in a biodegradability screening test”, *Ecotox. Env. Safety* 19, s. 204–211.

(14) Birch R. R. och Fletcher R. J. (1991), ”The application of dissolved inorganic carbon measurements to the study of aerobic biodegradability”, *Chemosphere* 23, s. 507–524.

(15) Birch R. R., Biver C., Campagna R., Gledhill W. E., Pagga U., Steber J., Reust H. och Bontinck W. J. (1989), ”Screening of chemicals for anaerobic biodegradation”, *Chemosphere* 19, s. 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 N. S. (1997), ”The ISO headspace $C0_2$ biodegradation test”, *Chemosphere* 34: s. 1813–1822.

(18) US EPA (1996), ”Fate, Transport and Transportation”, Series 835, 3120, ”Sealed vessel carbon dioxide production test”, Office, Prevention Pesticides and Toxic Substance, Washington, DC.

(19) Battersby N. S., Ciccognani D., Evans M. R., King D., Painter H.A., Peterson D. R. och Starkey M. (1999), ”An ’inherent’ biodegradability test for oil products: description and results of an international ring test”, *Chemosphere* 38, s. 3219–3235.

(20) Kapitel C.4 i denna bilaga, Bestämning av ”lätt” bionedbrytbarhet.

(21) OECD, 1988, ”OECD Ring-test of methods for determining ready biodegradability: Chairman’s report (M. Hashimoto; MITI) and final report (M. Kitano and M. Takatsuki; CITI)”, Paris.

(22) Kapitel C.11 i denna bilaga, Biologisk nedbrytbarhet – Aktiverat slam – Respirationshämningstest.

(23) Struijs J., Stoltenkamp-Wouterse M. J. och Dekkers A. L. M. (1995), ”A rationale for the appropriate amount of inoculum in ready biodegradability tests”, *Biodegradation* 6, s. 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, maj 1999, Medmenham, SL7 2HD, UK.

(25) ISO 10634 (1996) *Water Quality - Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium*.

▼M4

Tillägg 1

FÖRKORTNINGAR OCH DEFINITIONER

IC: oorganiskt kol.

$ThCO_2$: teoretisk koldioxid (mg) är den mängd koldioxid som enligt beräkningar produceras från känd eller beräknad kolhalt i testkemikalien vid fullständig mineralisering, också uttryckt som mg koldioxid som utvecklas per mg testkemikalie.

DOC: upplöst organiskt kol är den mängd organiskt kol som finns i lösningen eller som passerar ett 0,45-mikrometers filter eller som blir kvar i centrifugatet efter centrifugering vid cirka 4 000 g (cirka 40 000 m s^{-2}) i 15 minuter.

DIC: upplöst oorganiskt kol.

ThIC: teoretiskt oorganiskt kol.

TIC: totalt oorganiskt kol.

lätt bionedbrytbar: en godtycklig klass kemikalier som har klarat vissa specifika screeningtester för fullständig bionedbrytning; dessa tester är så krävande att man antar att kemikalierna snabbt bryts ned fullständigt i vattenmiljö i aeroba betingelser.

tiodagarsfönster: de 10 dagar som följer omedelbart efter att 10 % biologisk nedbrytning har uppnåtts.

lätt biologisk nedbrytbarhet: en klassificering för en kemikalie för vilken det finns otvetydiga belägg för biologisk nedbrytbarhet (primär eller fullständig) i alla tester för biologisk nedbrytbarhet.

fullständig aerob biologisk nedbrytning: den nivå av nedbrytning som nås när testkemikalien har förbrukats totalt av mikroorganismer under utveckling av koldioxid, vatten, mineralsalter och nya mikrobiella celler (biomassa).

mineralisering: mineralisering är en fullständig nedbrytning av en organisk kemikalie till CO_2 och H_2O i aeroba förhållanden, och till CH_4, CO_2 och H_2O i anaeroba förhållanden.

lagfas: tiden från teststart fram till acklimatisering och/eller anpassning av de nedbrytande mikroorganismerna och när nivån för biologisk nedbrytning av en testkemikalie eller organiskt material har nått upp till en detekterbar nivå (t.ex. 10 % teoretisk biologisk nedbrytning, eller lägre, beroende på mätningsteknikens precision).

nedbrytningsfas: tiden från lagfasens slut fram till den tidpunkt då 90 % av maximinivån för nedbrytning har nåtts.

platåfas: platåfasen inträffar när maximal nedbrytning har uppnåtts och bionedbrytningskurvan fasar ut.

testkemikalie: alla ämnen eller blandningar som testas med denna testmetod.

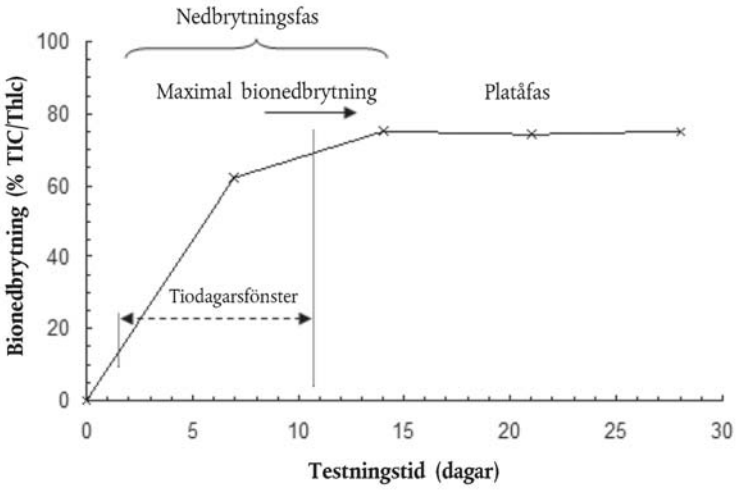
▼M4

Tillägg 2

Exempel på en bionedbrytningskurva

Figur 1

Biologisk nedbrytning av 1-oktanol i CO_2 Headspace-test



Ordlista:

Bionedbrytning

Nedbrytningsfas

Maximal bionedbrytning

Platåfas

Tiodagarsfönster

Testningstid (dagar)

▼M4

C.30 BIOACKUMULERING I JORDLEVANDE OLIGOCHAETER (FÅBORSTMASKAR)

INLEDNING

1. Denna testmetod motsvarar OECD:s testriktlinje 317 (2010). Bland testmetoderna rörande omvandling, spridning och nedbrytning i miljön publicerades Biokoncentration: Genomflödestest med fisk (kapitel C.13 i denna bilaga (49)) och bioackumulering i sedimentlevande bottenlevande oligochaeter (53) 1996 respektive 2008. Att extrapolera data om bioackumulering i vattenlevande organismer till jordlevande organismer såsom daggmaskar är svårt eller omöjligt. Modellberäkningar baserade på en testkemikalies lipofilicitet, t.ex. (14) (37), används för närvarande för bedömning av bioackumulering av kemikalier i jord, såsom t.ex. i EU:s tekniska vägledningsdokument (19). Behovet av en miljöspecifik testmetod har redan tagits upp, t.ex. (55). En sådan metod är särskilt viktig för utvärdering av sekundär förgiftning i livsmedelskedjan för jordlevande organismer (4). Det finns flera nationella testmetoder som behandlar bioackumulering i andra organismer än fisk, t.ex. (2) och (72). En metod för mätning av bioackumulering från förorenade jordar i daggmaskar (*Eisenia fetida,* Savigny) och ringmaskar har utvecklats av American Society for Testing and Materials (3). Genom en internationellt accepterad metod för bestämning av bioackumulering i spikad jord förbättras riskbedömningen av kemikalier i ekosystem i jordar, t.ex. (25) (29).

2. Jordätande invertebrater utsätts för jordbundna kemikalier. Bland dessa spelar jordlevande oligochaeter (fåborstmaskar) en viktig roll för jordarnas struktur och funktion (15) (20). Jordlevande oligochaeter lever i jorden och delvis på jordytan (särskilt i förnaskiktet) och de representerar ofta de vanligaste arterna i termer av biomassa (54). Genom att dessa sköter bioturbation av jorden och även utgör byte kan de ha en stark inverkan på kemikaliers biotillgänglighet för andra organismer såsom invertebrater (t.ex. jagande kvalster och skalbaggar, t.ex. (64)) eller jagande ryggradsdjur (t.ex. rävar och måsar) (18) (62). Vissa arter av jordlevande oligochaeter som för närvarande används för ekotoxikologisk testning beskrivs i tillägg 5.

3. I ASTM:s Standard Guide for Conducting Laboratory Soil Toxicity or Bioaccumulation Tests with the Lumbricid Earthworm *Eisenia fetida* and the Enchytraeid Potworm *Enchytraeus albidus* (3) finns många väsentliga och användbara uppgifter för hur man kan genomföra denna testmetod för bioackumulering. Övriga dokument som det hänvisas till inom den här testmetoden är kapitel C.13 i denna bilaga, Biokoncentration: Genomflödestest med fisk (49) och OECD:s testriktlinje 315: bioackumulering i sedimentlevande bottenlevande oligochaeter (53). Testmetoden bygger också i hög grad på praktisk erfarenhet från studier om bioackumulering i jordar och publicerad litteratur, t.ex. (1) (5) (11) (12) (28) (40) (43) (45) (57) (59) (76) (78) (79).

4. Testmetoden lämpar sig bäst för stabila, neutrala organiska kemikalier som tenderar att adsorberas till jordar. Testning av bioackumulering av stabila metallorganiska föreningar som binds till jord kan göras med denna testmetod. Testet kan också användas för metaller och andra spårelement.

FÖRUTSÄTTNINGAR

5. Tester för mätning av bioackumulering av en kemikalie i jordlevande oligochaeter har gjorts med tungmetaller (se t.ex. (63)) och långlivade organiska kemikalier med log K_{ow}-värden mellan 3,0 och 6,0, t.ex. (40). Sådana tester kan också användas för

— kemikalier som har log K_{ow} på 6,0 eller högre (superhydrofoba kemikalier),

▼M4

— kemikalier som tillhör en klass av organiska kemikalier som är kända för att ha potential att bioackumuleras i levande organismer, t.ex. ytaktiva eller mycket adsorptiva kemikalier,

— kemikalier vars strukturella egenskaper indikerar potential för bioackumulering, t.ex. analoger till kemikalier med känd bioackumuleringspotential,

— metaller.

6. Information om testkemikalien, såsom trivialnamn, kemiskt namn (helst enligt IUPAC), strukturformel, CAS-nummer, renhet, säkerhetsåtgärder, lämpliga lagringsförhållanden och analysmetoder bör inhämtas innan studien inleds. Därutöver bör det finnas information om

a) vattenlöslighet,

b) fördelningskoefficient oktanol-vatten, K_{ow},

c) fördelningskoefficient jord-vatten, K_{oc},

d) ångtryck,

e) nedbrytbarhet (t.ex. i jord, vatten),

f) kända metaboliter.

7. Radioaktivmärkta eller inte radioaktivmärkta testkemikalier kan användas. För att underlätta analysen rekommenderas dock radioaktivmärkta testkemikalier. Beslutet bör baseras på detektionsgränser eller krav på att mäta ursprunglig kemikalie och metaboliter. Om en radioaktivmärkt testkemikalie används och totala radioaktiva rester mäts, är det viktigt att de radioaktivmärkta resterna både i jorden och i testorganismerna analyseras för procentandelar av ursprunglig testkemikalie och radioaktivmärkta metaboliter, t.ex. i prover som tas i stabilt tillstånd eller i slutet av upptagningsfasen, för att göra det möjligt att beräkna bioackumuleringsfaktor (BAF) för den ursprungliga testkemikalien och berörda metaboliter i jorden (se punkt 50). Den metod som beskrivs här måste eventuellt modifieras, t.ex. för att ge tillräcklig biomassa för mätning av organiska testkemikalier som inte är radioaktivmärkta eller metaller. När totalmängden radioaktiva rester har uppmätts (genom vätskescintillationsräkning efter extraktion, förbränning eller vävnadsupplösning), baserar sig bioackumuleringsfaktorn på den ursprungliga kemikalien och metaboliterna. Beräkningen av bioackumuleringsfaktorn bör helst baseras på den ursprungliga testkemikaliens koncentration i organismerna och totalmängden radioaktiva rester. Ackumuleringsfaktorn biota-jord (BSAF), normaliserad till maskens fettinnehåll och jordens halt organiskt kol (OC) ska alltså beräknas utifrån BAF, med tanke på jämförbarhet mellan resultat från olika bioackumuleringstest.

8. Testkemikaliens toxicitet för de arter som används i testet bör vara känd, t.ex. en effektkoncentration (EC_x) eller en dödlig koncentration (LC_x) vid tidpunkten för upptagningsfasen, t.ex. (19). Den valda koncentrationen för testkemikalien bör helst vara 1 % av akut asymptotiskt LC_{50} och bör vara minst tiofaldig jämfört med detektionsgränsen i jord med den analysmetod som används. Helst bör toxicitetsvärden, om sådana finns, från långvariga studier om subletala endpoints användas (51) (52). Om sådana uppgifter inte finns kan test om akut toxicitet ge värdefull information (se t.ex. (23)).

▼M4

9. Det bör finnas en lämplig analysmetod med känd exakthet, precision och känslighet för kvantifiering av kemikalien i testlösningarna, i jorden och i det biologiska materialet, tillsammans med uppgifter om beredning och lagring av såväl prover som säkerhetsdatablad. De analytiska detektionsgränserna för testkemikalien i jord och maskvävnad bör också vara kända. Om en ^{14}C-märkt testkemikalie används, bör den specifika radioaktiviteten (Bq mol^{-1}) och den procentuella andelen radioaktivitet associerad med orenheter vara kända. Testkemikaliens specifika radioaktivitet bör vara tillräckligt hög för att möjliggöra analys, och de testkoncentrationer som används får inte framkalla toxiska effekter.

10. Testet kan genomföras med syntetiska eller naturliga jordar. Information om egenskaper hos naturlig jord som används, t.ex. ursprung eller beståndsdelar, pH, halten organiskt kol, partikelstorleksfördelning (procentandel sand, dy och lera) och vattenhållningskapacitet (WHC), bör vara känd innan testet inleds (3) (48).

PRINCIP FÖR TESTMETODEN

11. Till de parametrar som karakteriserar en testkemikalies bioackumulering hör bioackumuleringsfaktorn (BAF), upptagningskonstanten (k_s) och elimineringskonstanten (k_e). Definitioner av begreppen finns i tillägg 1.

12. Testet består av två faser: upptagningsfasen (exponering) och elimineringsfasen (efter exponering). Under upptagningsfasen exponeras replikerade grupper av maskar för jord som har spikats med testkemikalien. I tillägg till testdjuren hålls kontrollgrupper av maskar under identiska förhållanden utan testkemikalie. Testorganismernas torrvikt och fettinnehåll mäts. Detta kan göras med maskarna i kontrollgruppen. Analytiska bakgrundsvärden kan fås genom att analysera prover av kontrollmaskarna och kontrolljorden. För elimineringsfasen flyttas maskarna till en jord som inte innehåller testkemikalie. En elimineringsfas krävs alltid, med undantag för om upptaget av testkemikalie under exponeringen har varit obetydligt. Elimineringsfasen ger information om den hastighet med vilken testkemikalien utsöndras av testorganismerna (se t.ex. (27)). Om stabilt tillstånd inte uppnås under upptagningsfasen bör bestämningen av de kinetiska parametrarna – kinetisk bioackumuleringsfaktor BAF_k, upptagnings- och elimineringskonstanterna – helst baseras på simultan anpassning av resultaten från upptagnings- och elimineringsfaserna. Koncentrationen av testkemikalie i/på maskarna kontrolleras under testets båda faser.

13. Under upptagningsfasen görs mätningar vid provtagningstidpunkterna upp till 14 dagar (enchytraeider) eller 21 dagar (daggmaskar) tills stabilt tillstånd uppnås (11) (12) (67). Stabilt tillstånd uppnås när en kurva som plottas för koncentrationen i maskarna mot tiden blir parallell med tidsaxeln, och tre på varandra följande koncentrationsanalyser på prover som tas med minst två dagars mellanrum inte varierar med mer än ± 20 % sinsemellan baserat på statistiska jämförelser (t.ex. variansanalys, regressionsanalys).

14. För elimineringsfasen överförs testorganismerna till kärl som innehåller samma substrat men ingen testkemikalie. Under elimineringsfasen görs mätningar vid provtagningstidpunkterna under 14 dagar (enchytraeider) eller 21 dagar (daggmaskar), utom om tidigare analytisk bestämning visar en minskning på 90 % av testkemikalierester i maskarna. Koncentrationen av

▼M4

testkemikalie i maskarna i slutet av elimineringsfasen rapporteras som icke-eliminerade rester. Bioackumuleringsfaktorn vid stabilt tillstånd (BAF_{ss}) beräknas helst både som kvoten mellan koncentrationen i maskarna (Ca) och i jorden (Cs) vid uppenbar klart fastställt stabilt tillstånd, och som en kinetisk bioackumuleringsfaktor (BAFK) som kvoten mellan upptagningsfaktorn (k_s) och elimineringskonstanten (k_e) (för definitioner, se tillägg 1) utifrån ett antagande om första ordningens kinetik (för beräkningar, se tillägg 2). Om första ordningens kinetik uppenbart inte kan tillämpas, bör andra modeller användas.

15. Upptagningskonstanten, elimineringskonstanten (eller konstanterna, om andra modeller ingår), den kinetiska bioackumuleringsfaktorn (BAFK) och, där det är möjligt, konfidensgränserna för var och en av dessa parametrar beräknas utifrån datoriserade modellekvationer (se vägledning i tillägg 2). Anpassningens kvalitet (Goodness of fit) för valfri modell kan göras t.ex. utifrån korrelationskoefficienten eller determinationskoefficienten (koefficienter nära ett tyder på god kvalitet) eller testas med chi-två-test. Även värdet på medelfelet eller konfidensgränsen kring de uppskattade parametrarna kan ge indikation på anpassningens kvalitet för modellen.

16. För att minska testresultatens variation för testkemikalier med hög lipofilicitet bör bioackumuleringsfaktorerna uttryckas i förhållande till fettinnehållet och halten organiskt kol (kg organiskt kol i jorden per kg fett i mask). Denna princip är baserad på att det för vissa kemiska klasser finns ett klart samband mellan potentialen för bioackumulering och lipofilicitet, vilket har klart etablerats för fisk (47). Det finns ett förhållande mellan fettinnehållet i fisk och bioackumulering av sådana kemikalier. För bottenlevande (bentiska) organismer har man funnit liknande korrelationer (se t.ex. (30) (44)). Denna korrelation har även påvisats för jordlevande oligochaeter (se t.ex. (5), (6), (7) (14)). Om tillräcklig mängd maskvävnad finns att tillgå, kan testdjurens fettinnehåll bestämmas på samma biologiska material som används för bestämning av koncentrationen testkemikalie. Alternativt kan kontrolldjur användas för mätning av fettinnehållet.

TESTETS GILTIGHET

17. För att ett test ska vara giltigt måste följande kriterier uppfyllas för både kontroll- och behandlingsgrupperna:

— Vid slutet av testet får den totala dödligheten under upptagnings- och elimineringsfaserna inte överskrida 10 % (daggmaskar) eller 20 % (enchytraeider) av det totala antalet tillförda maskar.

— För *Eisenia fetida* och *Eisenia andrei* får medelförlusten uppmätt vid slutet av upptagningsfasen och vid slutet av elimineringsfasen inte överskrida 20 % jämfört med den ursprungliga färskvikten vid start av varje fas.

METODBESKRIVNING

Testarter

18. Det finns flera arter av jordlevande oligochaeter som rekommenderas för testning av bioackumulering. De oftast använda arterna *Eisenia fetida*, *Eisenia andrei* (Lumbricidae), *Enchytraeus albidus*, *Enchytraeus crypticus* eller *Enchytraeus luxuriosus* (Enchytraeidae) beskrivs i tillägg 5.

▼M4

Apparatur

19. Uppmärksamhet bör fästas vid att undvika användning av material (gäller alla delar av utrustningen) som kan upplösas, adsorbera testkemikalien eller läcka andra kemikalier och som kan ha negativa effekter på testdjuren. Standardmässiga rektangulära eller cylindriska kärl gjorda av kemiskt inert material kan användas, av lämplig storlek för antalet testmaskar. Rostfritt stål, plast eller glas kan användas för utrustning som är i kontakt med testmediet. Testkärlen ska vara tillbörligen täckta så att maskarna inte kan komma ut, samtidigt som tillräcklig lufttillförsel säkerställs. För kemikalier med höga adsorptionskoefficienter, såsom syntetiska pyretroider, kan det vara nödvändigt med silaniserat glas. I sådana situationer måste utrustningen kasseras efter användning (49). Det är viktigt att se till att radioaktivmärkta testämnen och flyktiga kemikalier inte kan läcka ut. Det bör finnas fällor (t.ex. gastvättflaskor av glas) som innehåller lämpliga adsorbenter som håller kvar eventuella rester som avdunstar från testkärlen.

Jord

20. Testjorden bör ha en kvalitet som ger testorganismerna möjlighet att överleva och helst föröka sig under acklimatiserings- och testperioderna utan avvikelser från normalt utseende och beteende. Maskarna bör vara inne i jorden.

21. Den syntetiska jord som beskrivs i kapitel C.8 i denna bilaga (48) rekommenderas som substrat för testningarna. Beredning av syntetisk jord för användning i bioackumuleringstest och rekommendationer för hur denna jord ska lagras beskrivs i tillägg 4. Lufttorkad syntetisk jord kan förvaras i rumstemperatur fram till användningen.

22. Även naturliga jordar från oförorenade platser kan användas som test- och/eller odlingsjord. För naturjordar bör minst anges ursprung (insamlingsplats), pH, halten organiskt kol, partikelstorleksfördelning (procentandel sand, dy och lera), maximal vattenhållningskapacitet (WHC_{max}) och procentuell andel vatten (3). Analys av jorden eller dess beståndsdelar med avseende på mikroföroreningar bör ge användbar information. Om fältjord från odlingsmark används, får den inte ha behandlats med växtskyddsprodukter eller gödsel från behandlade djur under minst ett år eller med organiska gödselmedel under minst sex månader innan jordprovet tas (50). De förfaranden som används för hantering av naturjordar innan dessa jordar används i ekotoxikologiska test med oligochaeter i laboratoriet beskrivs i (3). För naturjordar bör förvaringstiden i laboratoriet minimeras.

Applicering av testkemikalien

23. Testkemikalien blandas in i jorden. Testkemikaliens fysikalkemiska egenskaper bör beaktas. En vattenlöslig testkemikalie bör upplösas fullständigt i vatten innan den blandas med jorden. Det rekommenderade spikningsförfarandet för dåligt vattenlösliga kemikalier är att en eller flera beståndsdelar i (den syntetiska) jorden beläggs med testkemikalien. Till exempel kan kvartssand eller en del av den dränkas in med en lösning av testkemikalien i lämpligt organiskt lösningsmedel som får avdunsta långsamt tills det torkat bort. Därefter kan den belagda jordfraktionen blandas i den våta jorden. En viktig fördel med detta förfarande är att inget lösningsmedel tillförs jorden.

▼M4

När naturjord används kan testkemikalien tillsättas genom att spika en lufttorkad del av jorden enligt det som beskrivs ovan för syntetisk jord, eller genom att blanda in testkemikalien i våt jord, med ett efterföljande avdunstningssteg om ett solubiliseringsmedel används. Allmänt taget bör man så långt som möjligt undvika kontakt mellan våt jord och lösningsmedel. Följande bör beaktas (3):

— Om annat lösningsmedel än vatten används, bör det vara blandningsbart med vatten och/eller kunna avlägsnas (t.ex. genom avdunstning) så att endast testkemikalien blir kvar i jorden.

— Om lösningsmedelskontroll används behövs ingen negativ kontroll. Lösningsmedelskontrollen bör ha den högsta koncentrationen av lösningsmedel som tillförs jorden och lösningsmedlet bör härstamma från samma sats som används för beredning av stamlösningen. Lösningsmedlets toxicitet och flyktighet och testkemikaliens löslighet i det valda lösningsmedlet bör vara de huvudsakliga kriterierna vid valet av lämpligt solubiliseringsmedel.

24. För kemikalier med dålig löslighet i vatten och organiska lösningsmedel kan 2,0–2,5 g finmald kvartssand per testkärl blandas med mängden testkemikalie, t.ex. genom mortling, för att få önskad testkoncentration. Blandningen av kvartssand och testkemikalie tillförs den förhandsfuktade jorden och blandas omsorgsfullt med lämplig mängd avjoniserat vatten för att få önskad fukthalt. Den slutliga blandningen fördelas i testkärlen. Förfarandet upprepas för varje testkoncentration och likaså bereds en lämplig kontroll med 2,0–2,5 g finmald kvartssand per testkärl.

25. Koncentrationen av testkemikalie i jorden bör fastställas efter spikning. Innan testorganismerna tillförs jorden bör det kontrolleras att testkemikalien är homogent fördelad i jorden. Metoden för spikning och motivering för valet av ett visst spikningsförfarande bör rapporteras (24).

26. Jämvikten mellan jorden och porvattenfasen bör idealiskt sett etableras innan organismerna tillförs; en tidsperiod på fyra dagar vid 20 °C rekommenderas. För ett antal dåligt vattenlösliga organiska kemikalier kan tiden för att nå faktisk jämvikt mellan adsorberade och upplösta fraktioner räknas i dagar eller månader. Beroende på studiens ändamål, t.ex. om man vill efterlikna vissa miljöförhållanden, kan den spikade jorden få ”åldras” för en längre period, t.ex. för metaller i tre veckor vid 20 °C (22).

Odling av testorganismer

27. Maskarna bör helst hållas i en permanent laboratorieodling. Vägledning om laboratorieodlingsmetoder för *Eisenia fetida* och *Eisenia andrei* och arter av enchytraeider finns i tillägg 5 (se också (48) (51) (52)).

28. Maskarna som används för testet bör vara fria från synliga sjukdomar, abnormaliteter och parasiter.

TESTFÖRFARANDE

29. Testorganismerna exponeras för testkemikalien under upptagningsfasen. Upptagningsfasen ska pågå i 14 dagar (enchytraeider) eller 21 dagar (daggmaskar) utom om det kan påvisas att stabilt stadium har uppnåtts.

▼M4

30. För elimineringsfasen flyttas maskarna till en jord som inte innehåller testkemikalie. Den första provtagningen bör göras 4–24 timmar efter elimineringsfasens början. Exempel på provtagningsschema för en 21-dagars upptagningsfas och en 21-dagars elimineringsfas finns i tillägg 3.

Testorganismer

31. Många arter av jordlevande enchytraeider har en mycket låg individuell vikt (t.ex. 5–10 mg våtvikt per individ för *Enchytraeus albidus* och mindre för *Enchytraeus crypticus* eller *Enchytraeus luxuriosus*). För vägning och kemisk analys kan det vara nödvändigt att poola maskarna i replikattestkärlen (dvs. alla maskar i ett replikatkärl för att få de analytiska vävnadsresultaten). Tjugo individer enchytraeider tillförs varje replikat, och antalet replikat bör vara minst tre. Om testkemikaliens analytiska detektionsgräns är hög kan det krävas flera maskar. För testarter med högre individuell vikt (*Eisenia fetida* och *Eisenia andrei*) kan replikatkärl med en enda individ användas.

32. Daggmaskar som används i ett test bör ha liknande vikt (t.ex. *Eisenia fetida* och *Eisenia andrei* bör ha en individuell vikt på 250–600 mg). Enchytraeider (t.ex. *Enchytraeus albidus*) bör ha en längd på cirka 1 cm. Alla maskar som används i ett visst test bör komma från samma källa och vara vuxna individer med clitellum (gördel) (se tillägg 5). Eftersom ett djurs vikt och ålder kan påverka BAF-värdena (t.ex. beroende på varierande fettinnehåll och/eller förekomsten av ägg), bör dessa parametrar registreras noggrant och beaktas vid tolkningen av resultaten. Dessutom kan kokonger deponeras under exponeringsperioden, vilket också påverkar BAF-värdena. Det rekommenderas att ett delprov av testmaskarna vägs före testet för att få en uppskattning av våt och torr medelvikt.

33. Förhållandet mellan jord och maskar bör vara högt för att minimera sjunkande koncentration av testkemikalien i jorden under upptagningsfasen. För *Eisenia fetida* och *Eisenia andrei* bör det finnas en minimimängd på 50 g jord (torrvikt) per mask och för enchytraeider rekommenderas en minimimängd på 10–20 g jord (torrvikt) per testkärl. Jordlagret i kärlen bör vara 2–3 cm (enchytraeider) eller 4–5 cm (daggmaskar).

34. Testmaskarna tas bort ur odlingen (t.ex. enchytraeider med användning av guldsmedstång). Vuxna exemplar överförs till obehandlad testjord för acklimatisering och ges föda (se punkt 36). Om testbetingelserna avviker från odlingsbetingelserna bör en acklimatiseringsfas på 24–72 timmar vara tillräcklig för att maskarna ska anpassa sig till testbetingelserna. Efter acklimatiseringen sköljs maskarna genom att överföras till glaskärl (t.ex. petriskålar) som innehåller rent vatten, och därefter vägs maskarna innan de överförs till testjorden. Före vägningen ska överskottsvatten avlägsnas från maskarna genom att försiktigt stryka av dem längs skålens kant eller försiktigt torka av dem med en lätt fuktad pappersduk.

35. Testorganismernas nedgrävningsbeteende bör observeras och registreras. I test med daggmaskar gräver sig djuren (kontroll och behandling) in i jorden inom några timmar; detta bör kontrolleras senast 24 timmar efter att maskarna har placerats i testkärlen. Om maskarna inte gräver in sig i jorden (t.ex. över 10 % mer än hälften av maskarna i upptagningsfasen), tyder detta på att

▼M4

testbetingelserna är olämpliga eller att testorganismerna inte är friska. Då bör testet stoppas och göras på nytt. Enchytraeiderna vistas i huvudsak i jordens håligheter och det är vanligt att deras integument inte alltid kommer i kontakt med omgivande substrat; exponeringen av grävande och icke-grävande enchytraeider antas vara ekvivalent och om enchytraeiderna inte gräver in sig i jorden betyder detta inte nödvändigtvis att testet måste upprepas.

Utfodring

36. Utfodring rekommenderas om jorden har låg halt totalt organiskt kol. Om syntetisk jord används rekommenderas veckovis utfodring (dvs. maskarna får föda en gång i veckan) med 7 mg torr dynga per g torrvikt jord för daggmaskar och en veckovis mängd på 2–2,5 mg malda havreflingor per g torrvikt jord för enchytraeider (11). Den första portionen föda bör blandas med jorden omedelbart innan testorganismerna tillförs. Helst ska samma typ av föda som i odlingarna användas (tillägg 5).

Ljus och temperatur

37. Testningarna bör genomföras med en kontrollerad ljus/mörker-cykel på 16/8 timmar, helst med 400–800 lx i området där testkärlen finns (3). Testtemperaturen bör vara 20 ± 2 °C under hela testet.

Testkoncentrationer

38. En enda koncentration används. Om ytterligare koncentrationer används måste detta motiveras. Om testkemikaliens toxicitet (ECx) ligger nära den analytiska detektionsgränsen rekommenderas användning av radioaktivmärkt testkemikalie med hög specifik radioaktivitet. För metaller bör koncentrationen ligga över bakgrundsnivåerna i vävnad och jord.

Replikat

39. För kinetikmätningar (upptagnings- och elimineringsfaserna) bör det finnas minst tre behandlade replikatkärl per provtagningspunkt. Totalantalet replikat som bereds bör vara tillräckligt för att täcka alla provtagningstidpunkter under upptagnings- och elimineringsfaserna.

40. För biologiska observationer och mätningar (t.ex. förhållandet mellan torrvikt och våtvikt, fettinnehåll) samt för analys av bakgrundskoncentrationerna i maskar och jord, bör minst 12 replikatkärl med negativ kontroll (fyra provtagningar vid start, fyra vid slutet av upptagningen och fyra vid slutet av elimineringen) beredas om inget annat lösningsmedel än vatten används. Om solubiliseringsmedel används för applicering av testkemikalien bör det finnas en lösningsmedelskontroll (fyra replikatkärl för provtagningen vid start, fyra vid slutet av upptagningen och fyra vid slutet av elimineringen) som innehåller alla beståndsdelar utom testämnet och som körs i tillägg till de behandlade replikaten. I detta fall kan fyra ytterligare replikatkärl med negativ kontroll (inget lösningsmedel) även användas för frivillig provtagning i slutet av upptagningsfasen. Dessa replikat kan jämföras biologiskt med lösningsmedelskontrollen för att få information om eventuella effekter av lösningsmedlet på testorganismerna. Likaså rekommenderas ett tillräckligt antal ytterligare reservreplikatkärl (t.ex. åtta) för behandling och kontroll(er).

▼M4

Frekvens för kvalitetsmätning av jord

41. Vid start och slut av upptagnings- och elimineringsfaserna bör jordens pH, fukthalt och temperatur mätas (kontinuerligt). En gång per vecka bör jordens fukthalt kontrolleras genom att väga testkärlen och jämföra de vikterna med vikterna vid testets början. Vattenförlust bör kompenseras genom tillförsel av avjoniserat vatten.

Provtagning och analys av maskar och jord

42. Exempel på ett schema för upptagnings- och eliminationsfaserna i bioackumuleringstest för daggmaskar och enchytraeider finns i tillägg 3.

43. Jordprover tas från testkärlen för bestämning av koncentrationen testkemikalie innan maskarna tillförs, samt under upptagnings- och elimineringsfaserna. Under testet bestäms koncentrationerna testkemikalie i maskarna och jorden. I regel mäts de totala koncentrationerna i jorden. Alternativt kan koncentrationerna i porvatten mätas, och då bör motivering och lämpliga metoder fastställas innan studien inleds, och inkluderas i rapporten.

44. Prover av maskar och jord tas minst sex gånger under upptagnings- och elimineringsfaserna. Om man kan påvisa att testkemikalien är stabil, kan antalet jordanalyser reduceras. Det rekommenderas att minst tre replikat analyseras i början och slutet av upptagningsfasen. Om koncentrationen i jord uppmätt i slutet av upptagningsfasen avviker från den ursprungliga koncentrationen med mer än 30 %, bör även jordprover som tagits andra dagar analyseras.

45. Ta bort maskarna i ett givet replikat varje gång prover ska tas (t.ex. genom att sprida ut jorden på en grund bricka och plocka bort maskarna med en mjuk guldsmedstång), och skölj dem snabbt i vatten på en grund glas- eller stålbricka. Avlägsna överflödigt vatten (se punkt 34). Överför maskarna försiktigt till ett förhandsvägt kärl och väg omedelbart kärlet plus maskar inklusive tarminnehåll.

46. Därefter bör daggmaskarna (*Eisena* sp.) lämnas över natten för tömning av tarminnehåll, t.ex. på ett fuktat filterpapper i en täckt petriskål (se punkt 34). Efter tömningen bestäms maskarnas vikt i syfte att bedöma eventuell minskning av biomassa under testet (se giltighetskriterierna i punkt 17). Vägning och vävnadsanalys av enchytraeider görs utan tarmtömning, eftersom detta är tekniskt svårt på grund av att maskarna är så små. Efter slutlig viktbestämning bör maskarna avlivas omedelbart med lämpligaste metod (t.ex. med flytande kväve eller nedfrysning under 18 °C).

47. Under elimineringsfasen ersätter maskarna förorenat tarminnehåll med ren jord. Det betyder att mätningar i otömda maskar (i detta fall enchytraeider) som tas ut omedelbart före elimineringsfasen inkluderar förorenad jord i tarmen. För vattenlevande oligochaeter antas att största delen av förorenat tarminnehåll har ersatts med rent sediment efter de första 4–24 timmarna av elimineringsfasen (se t.ex. (46)). Liknande resultat har rapporterats för daggmaskar i studier rörande ackumulering av radioaktivmärkt kadmium och zink (78). För icke-tömda enchytraeider kan koncentrationen i detta första prov från elimineringsfasen anses vara koncentrationen i vävnad efter tarmtömning. För att beakta den utspädning av testämneskoncentrationen som kan tillskrivas oförorenad jord under elimineringsfasen kan tarminnehållets vikt uppskattas från förhållandena mellan maskarnas våtvikt/askvikt eller torrvikt/askvikt.

▼M4

48. Jord- och maskproverna bör helst analyseras omedelbart efter att de tagits (inom 1–2 dagar) för att undvika nedbrytning eller andra förluster, och det rekommenderas att ungefärliga värden för upptagning och eliminering beräknas medan testet framskrider. Om analysen måste vänta, bör proverna förvaras på lämpligt sätt, t.ex. i djupfryst form (≤ –18 °C).

49. Kontroll bör göras av att den kemiska analysens precision och reproducerbarhet, såväl som extraktion av testkemikalie från jord- och maskproverna är tillfredsställande för den metod det gäller, och extraktionseffektiviteten, detektionsgränsen (LOD) och kvantifieringsgränsen (LOQ) bör rapporteras. Dessutom bör man kontrollera att testkemikalien inte kan detekteras i kontrollkärlen i koncentrationer som är högre än bakgrunden. Om koncentrationen av testkemikalie i testorganismen C_a är > 0 i kontrollmaskarna, bör detta inkluderas i beräkningen av de kinetiska parametrarna (se tillägg 2). Genom hela testet bör alla prover hanteras med tanke på minsta möjliga förorening och förlust (t.ex. till följd av att testkemikalien adsorberas på provtagningsutrustningen).

50. När radioaktivitetsmärkta testkemikalier används är det möjligt att analysera ursprunglig kemikalie och metaboliter. Kvantifiering av ursprunglig testkemikalie och metaboliter vid stabilt tillstånd eller i slutet av upptagningsfasen ger viktig information. Proverna bör sedan putsas upp så att den ursprungliga testkemikalien kan kvantifieras separat. Om mängden av en enskild metabolit överskrider 10 % av den totala radioaktiviteten i det analyserade provet (de analyserade proverna) rekommenderas identifiering av dessa metaboliter.

51. Det totala utbytet, och utbytet av testkemikalie i maskar, jord och i förekommande fall fällor med adsorbenter som fångar upp avdunstad testkemikalie, bör registreras och rapporteras.

52. Pooling av enskilda prover från ett givet testkärl godtas för enchytraeider som är mindre än daggmaskar. Om poolingen inbegriper minskning av antalet replikat, begränsas de statistiska förfaranden som kan användas på erhållna data. Om det krävs ett specifikt statistiskt förfarande och en specifik tyngd, bör testet omfatta tillräckligt många replikatkärl för att få den pooling, det förfarande och den tyngd som önskas.

53. Det rekommenderas att BAF uttrycks både som funktion av total torrvikt och, när så krävs (t.ex. för starkt hydrofoba kemikalier), som en funktion av fettinnehållet. Lämpliga metoder bör användas för bestämning av fettinnehållet (vissa befintliga metoder, t.ex. (31) (58), bör anpassas för ändamålet). Dessa metoder bygger på en kloroform/metanol-extraktionsteknik. För att undvika klorerade lösningsmedel bör en modifiering av Bligh och Dyer-metoden (9) enligt beskrivningen i (17) användas. Eftersom de olika metoderna inte ger identiska värden, är det viktigt att beskriva den metod som använts. Om det är möjligt, dvs. om det finns tillräckligt med maskvävnad att tillgå, bör analysen av fettinnehåll helst göras på samma prov eller extrakt som det som används för analys av testkemikalien, eftersom fetterna ofta måste avlägsnas från extraktet innan det kan analyseras kromatografiskt (49). Alternativt kan kontrolldjur användas för att mäta fettinnehållet, som sedan kan användas för att normalisera BAF-värdena. Det senare förfarandet minskar föroreningen av utrustningen med testkemikalien.

▼M4

DATA OCH RAPPORTERING

Behandling av resultaten

54. Upptagningskurvan för testkemikalien erhålls genom att plotta koncentrationen i/på maskarna under upptagningsfasen mot tiden enligt aritmetisk skala. När kurvan har nått en platå eller stabilt tillstånd (se definitionerna i tillägg 1) kan bioackumuleringsfaktorn vid stabilt tillstånd BAF_{ss} beräknas enligt följande:

$$\frac{C_a \text{ vid stabilt tillstånd eller slutet av upptagningsfasen (genomsnitt)}}{C_s \text{ vid stabilt tillstånd eller slutet av upptagningsfasen (genomsnitt)}}$$

C_a är testkemikaliens koncentration i testorganismen

C_s är testkemikaliens koncentration i jorden

55. Om stabilt tillstånd inte uppnås bör man i stället för att bestämma BAF_{ss} bestämma BAFK på grundval av upptagnings- och elimineringskonstanterna, enligt följande:

— Bestäm ackumuleringsfaktorn (BAF_K) som kvoten k_s/k_e.

— Upptagning och eliminering ska helst beräknas samtidigt (se ekvation 11 i tillägg 2).

— Elimineringskonstanten (k_e) bestäms i regel från elimineringskurvan (koncentrationen av testämnet i maskarna under elimineringsfasen). Därefter beräknas upptagningskonstanten k_s utifrån k_e, och ett värde på C_a som härleds från upptagningskurvan – se tillägg 2 för en beskrivning av dessa metoder. För att få BAF_K och konstanterna k_s och k_e rekommenderas datorstödda icke-linjära parameteruppskattningsmetoder. Om eliminering uppenbart inte är av första ordningen bör mer komplexa modeller användas.

Testrapport

56. Testrapporten ska innehålla följande information:

Testkemikalie:

— All tillgänglig information om akut toxicitet eller långtidstoxicitet (t.ex. EC_x, $LC_{x,,}$ NOEC) av testkemikalien på jordlevande oligochaeter.

— Renhet, fysikalisk natur och fysikalkemiska egenskaper, t.ex. log K_{ow}, vattenlöslighet.

— Kemisk identifiering, källa, identitet och koncentration för eventuella lösningsmedel som använts.

— Om radioaktivmärkta testkemikalier används, uppgifter om exakt position för de märkta atomerna, specifik radioaktivitet och radiokemisk renhet.

Testarter:

— Vetenskapligt namn, stam, eventuell förbehandling, acklimatisering, ålder, storleksintervall osv.

▼M4

Testbetingelser:

— Testförfarande.

— Belysningens typ, egenskaper och ljusperiod(er).

— Testets utformning (t.ex. antalet kärl, kärlstorlek, jordmassa, jordlagrets tjocklek, antalet replikat, antalet maskar per replikat, antalet testkoncentrationer, upptagnings- och elimineringsfasernas varaktighet samt provtagningsfrekvens.

— Motivering för valet av testkärlens material.

— Metod för beredning och applicering av testämne samt motivering för valet av en specifik metod.

— Nominella testkoncentrationer, medelvärde för uppmätta värden och deras standardavvikelse i testkärlen och metoden för att erhålla dessa värden.

— Källa för beståndsdelarna i syntetisk jord eller – om naturligt medium används – jordens ursprung, beskrivning av eventuell förbehandling, resultat för kontrollerna (överlevnad, utveckling av biomassa och reproduktion), jordens egenskaper (pH, totalhalten organiskt kol, partikelstorleksfördelning (procent sand, dy och lera), WHC_{max}, procentandelen vatten vid testets början och slut samt alla andra mätningar som har gjorts.

— Detaljerad information om behandling av jord- och maskprover, inbegripet detaljer om beredning, lagring, spikningsförfaranden, extraktion och analytiska förfaranden (inklusive precision) för testämne i maskar och jord, fettinnehåll (om uppmätt) och utbyte för testämnet.

Resultat:

— Mortalitet för kontrollmaskarna och maskarna i varje testkärl och allt observerat onormalt beteende (t.ex. undvikande av jorden och utebliven reproduktion i bioackumuleringstest med enchytraeider).

— Förhållandet mellan torrvikt och våtvikt för jorden och testorganismerna (utnyttjas vid normalisering).

— Maskarnas våtvikt vid varje provtagningstidpunkt; för daggmaskar våtvikterna vid testets början och vid varje provtagningstidpunkt före och efter tarmtömning.

— Testorganismernas fettinnehåll (om detta bestäms).

— Kurvor som visar upptagnings- -och elimineringskinetiken för testkemikalien i maskarna och tiden fram till stabilt tillstånd.

— C_a och C_s (med standardavvikelse och område, om lämpligt) för alla provtagningstidpunkter (C_a uttryckt som g per kg våtvikt och torrvikt för hela kroppen, C_s uttryckt som g per kg våtvikt och torrvikt för jord). Om det krävs en ackumuleringsfaktor biota-jord (BSAF) (t.ex. för jämförelse av resultat från två eller flera test med djur som har olika fettinnehåll), kan C_a även uttryckas som g per kg fettinnehåll i organismen och C_s kan uttryckas som g per kg organiskt kol i jorden.

— BAF (uttryckt som kg jord per kg mask), jordens upptagningskonstant k_s (uttryckt som g jord per kg mask per dag) och elimineringskonstanten k_e (uttryckt per dag), BSAF (uttryckt som kg totalt organiskt kol i jorden per kg fettinnehåll i mask) kan också rapporteras.

▼M4

— Om uppmätt: procentandelen ursprunglig kemikalie, metaboliter och bundna rester (den procentandel testkemikalie som inte kan extraheras med vanliga extraktionsmetoder) som detekteras i jord och testdjur.

— Metoder som använts för statistiska analyser av data.

Utvärdering av resultaten

— Resultatens överensstämmelse med giltighetskriterierna som förtecknas i punkt 17.

— Oförväntade eller ovanliga resultat, t.ex. ofullständig eliminering av testkemikalien från testdjuren.

LITTERATUR

(1) Amorim M. (2000), ”Chronic and toxicokinetic behavior of Lindane (γ-HCH) in the Enchytraeid *Enchytraeus albidus*”, examensarbete, 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* (2004), s. 26.

(4) Beek B., Boehling S., Bruckmann U., Franke C., Joehncke U., Studinger G. (2000), ”The assessment of bioaccumulation”, I Hutzinger, O. (red.) *The Handbook of Environmental Chemistry*, Vol. 2 Part J (Vol. editor: B. Beek), ”Bioaccumulation - New Aspects and Developments”, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, s. 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, s. 93–99.

(6) Belfroid A., Van Wezel A., Sikkenk M., Van Gestel C., Seinen W. och Hermens J. (1993). ”The toxicokinetic behavior of chlorobenzenes in earthworms (*Eisenia andrei*): Experiments in water”, *Ecotox. Environ. Safety* 25, s. 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, s. 185–191.

(8) Bell A. W. (1958), ”The anatomy of *Enchytraeus albidus*, with a key to the species of the genus *Enchytraeus”, ann. Mus. Novitat.* 1902, s. 1–13.

(9) Bligh E. G. och Dyer W. J. (1959), ”A rapid method of total lipid extraction and purification”, *Can. J. Biochem.* Pysiol. 37, s. 911–917.

(10) Bouche M. (1972), ”Lombriciens de France. Ecologie et Systematique”, *INRA, Annales de Zoologie-Ecologie animale*, Paris, s. 671.

(11) Bruns E., Egeler Ph., Moser T., Römbke J., Scheffczyk A, Spörlein P. (2001a), ”Standardisierung und Validierung eines Bioakkumulationstests mit terrestrischen Oligochaeten”, rapport till tyska federala miljöbyrån (Umweltbundesamt Berlin), R&D nr 298, s. 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, s. 185–196.

(13) Conder J. M. och Lanno R. P. (2003), ”Lethal critical body residues as measures of Cd, Pb, and Zn bioavailability and toxicity in the earthworm *Eisenia fetida”, J. Soils Sediments* 3, s. 13–20.

▼M4

(14) Connell D. W. och Markwell R. D. (1990), ”Bioaccumulation in the Soil to Earthworm System”, *Chemosphere* 20, s. 91–100.

(15) Didden W. A. M. (1993), ”Ecology of Terrestrial Enchytraeidae”, *Pedobiologia* 37, s. 2–29.

(16) Didden W. (2003), ”Oligochaeta”, i *Bioindicators and biomonitors*, Markert, B. A., Breure, A.M. och Zechmeister, H. G. (red.) Elsevier Science Ltd, Nederländerna, 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 D. R., 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, s. 140–145.

(19) Europaparlamentets och rådets förordning (EG) nr 1907/2006 av den 18 december 2006 om registrering, utvärdering, godkännande och begränsning av kemikalier (Reach), inrättande av en europeisk kemikaliemyndighet, ändring av direktiv 1999/45/EG och upphävande av rådets förordning (EEG) nr 793/93 och kommissionens förordning (EG) nr 1488/94 samt rådets direktiv 76/769/EEG och kommissionens direktiv 91/155/EEG, 93/67/EEG, 93/105/EG och 2000/21/EG, EUT L 396, 30.12.2006, s. 1.

(20) Edwards C. A. och Bohlen P. J. (1996), ”Biology and ecology of earthworms”, Tredje utgåvan, Chapman & Hall, London, s. 426.

(21) OECD (2008), *Bioaccumulation in Sediment-dwelling Benthic Oligochates*, Test Guideline No. 315, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris.

(22) Egeler Ph., Gilberg D., Scheffczyk A., Moser Th. och Römbke J. (2009), ”Validation of a Soil Bioaccumulation Test with Terrestrial Oligochaetes by an International Ring Test (Validierung einer Methode zur standardisierten Messung der Bioakkumulation mit terrestrischen Oligochaeten)”, rapport till tyska federala miljöbyrån (Umweltbundesamt Dessau-Rosslau), R&D nr 204 67 458, s. 149. Finns för nedladdning på: http://www.oecd.org/data-oecd/12/20/42552727.pdf

(23) Elmegaard N. och Jagers op Akkerhuis G. A. J. M. (2000), ”Safety factors in pesticide risk assessment, Differences in species sensitivity and acute-chronic relations”, National Environmental Research Institute, *NERI Technical Report* 325, s. 57.

(24) Environment Kanada (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, s. 195–208.

(26) Franke C. (1996), ”How meaningful is the bioconcentration factor for risk assessment?”, *Chemosphere* 32, s. 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, s. 1501–1514.

(28) Füll C. (1996), ”Bioakkumulation und Metabolismus von -1,2,3,4,5,6-Hexachlorcyclohexan (Lindan) und 2-(2,4-Dichlorphenoxy)-propionsäure (Dichlorprop) beim Regenwurm *Lumbricus rubellus* (Oligochaeta, Lumbricidae)”, Dissertation University Mainz, s. 156.

▼M4

(29) Füll C., Schulte C., Kula C. (2003), ”Bewertung der Auswirkungen von Pflanzenschutzmitteln auf Regenwürmer”, *UWSF - Z. Umweltchem, Ökotox.* 15, s. 78–84.

(30) Gabric A. J., Connell D. W., Bell P. R. F. (1990), ”A kinetic model for bioconcentration of lipophilic compounds by oligochaetes”, *Wat. Res.* 24, s. 1225–1231.

(31) Gardner W. S., Frez W. A., Cichocki E. A., Parrish C. C. (1985), ”Micro-methods for lipids in aquatic invertebrates”, *Limnology and Oceanography* 30, s. 1099–1105.

(32) Hawker D. W. och Connell D. W. (1988), ”Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish”, *Wat. Res.* 22, s. 701–707.

(33) Hund-Rinke K. och Wiechering H. (2000), ”Earthworm avoidance test for soil assessments: An alternative for acute and reproduction tests”, *J. Soils Sediments* 1, s. 15–20.

(34) Hund-Rinke K., Römbke J., Riepert F., Achazi R. (2000), ”Beurteilung der Lebensraumfunktion von Böden mit Hilfe von Regenwurmtests” ingår i ”Toxikologische Beurteilung von Böden”, Heiden, S., Erb, R., Dott, W. och Eisentraeger, A. (red.), Spektrum Verl., Heidelberg, s. 59–81.

(35) ISO 11268–2 (1998), *Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (Eisenia fetida)*. Del 2: *Determination of effects on reproduction*.

(36) Jaenike J. (1982), ”E*isenia foetida* is two biological species”, *Megadrilogica* 4, s. 6–8.

(37) Jager T. (1998), ”Mechanistic approach for estimating bioconcentration of organic chemicals in earthworms (Oligochaeta)”, *Environ. Toxicol. Chem.* 17, s. 2080–2090.

(38) Jager T., Sanchez P. A., 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, s. 953–961.

(39) Jager T., Baerselman R., Dijkman E., De Groot A. C., Hogendoorn E. A., DeJong A., Kruitbosch J. A. W., 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, s. 767–775.

(40) Jager T., Fleuren R. L. J., Hoogendoorn E., de Korte G. (2003b), ”Elucidating the routes of exposure for organic chemicals in the earthworm, *Eisenia andrei* (Oligochaeta)”, *Environ. Sci. Technol.* 37, s. 3399–3404.

(41) Janssen M. P. M., Bruins A., De Vries T. H., Van Straalen N. M. (1991), ”Comparison of cadmium kinetics in four soil arthropod species”, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 20, s. 305–312.

(42) Kasprzak K, (1982), ”Review of enchytraeid community structure and function in agricultural ecosystems”, *Pedobiologia* 23, s. 217–232.

(43) Khalil A. M. (1990), ”Aufnahme und Metabolismus von ^{14}C-Hexachlorbenzol und ^{14}C-Pentachlornitrobenzol in Regenwürmern”, *Dissertation University München*, s. 137.

(44) Landrum P. F. (1989), ”Bioavailability and toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed to sediments for the amphipod *Pontoporeia hoyi”, Environ. Sci. Toxicol.* 23, s. 588–595.

(45) Marinussen M. P. J. C., Van der Zee S. E. A. T. M., De Haan F. A. (1997), ”Cu accumulation in *Lumbricus rubellus* under laboratory conditions compared with accumulation under field conditions”, *Ecotox. Environ. Safety* 36, s. 17–26.

(46) Mount D. R., Dawson T. D., Burkhard L. P. (1999), ”Implications of gut purging for tissue residues determined in bioaccumulation testing of sediment with *Lumbriculus variegates”, Environ. Toxicol. Chem.* 18, s. 1244–1249.

▼M4

(47) Nendza M. (1991), ”QSARs of bioaccumulation: Validity assessment of log K_{ow}/log BCF correlations”, i R. Nagel och R. Loskill (red.): *Bioaccumulation in aquatic systems, Contributions to the assessment, Proceedings of an international workshop*, Berlin 1990, VCH, Weinheim.

(48) Kapitel C.8 i denna bilaga, Toxicitet hos daggmaskar.

(49) Kapitel C.13 i denna bilaga, Biokoncentration: Genomflödesprovning med fisk.

(50) Kapitel C.21 i denna bilaga, Jordlevande mikroorganismer: Test rörande omvandling av kväve.

(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. och Luxton M. (1982), ”A comparative analysis of soil fauna populations and their role in decomposition processes”, *Oikos* 39, s. 287–388.

(55) Phillips D. J. H. (1993), ”Bioaccumulation”, ingår i *Handbook of Ecotoxicology* Vol. 1, Calow P. (red.). Blackwell Scientific Publ., Oxford, s. 378–396.

(56) Pflugmacher J. (1992), ”Struktur-Aktivitätsbestimmungen (QSAR) zwischen der Konzentration von Pflanzenschutzmitteln und dem Octanol-Wasser-Koeffzienten”, *UWSF- Z. Umweltchem. Ökotox*, 4, s. 77–81.

(57) Posthuma L., Weltje L., Anton-Sanchez F. A. (1996), ”oint toxic effects of cadmium and pyrene on reproduction and growth of the earthworm *Eisenia fetida”, RIVM Report No. 607506001*, Bilthoven.

(58) Randall R. C., Lee II H., Ozretich R. J., Lake J. L., Pruell R. J. (1991), ”Evaluation of selected lipid methods for normalising pollutant bioaccumulation”, *Environ.Toxicol. Chem.* 10, s. 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. och Moser Th. (1999), ”Organisation and performance of an international ring-test for the validation of the Enchytraeid reproduction test”*UBA-Texte* 4/99, s. 373.

(61) Römbke J., Riepert F., Achazi R. (2000), ”Enchytraeen als Testorganismen”, i ”Toxikologische Beurteilung von Böden”, Heiden S., Erb, R., Dott, W. och Eisentraeger, A. (reds), *Spektrum Verl*., Heidelberg, s. 105–129.

(62) Romijn CA. FM., Luttik R., Van De Meent D., Slooff W.,Canton J. H. (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, s. 107–127.

(63) Sample B. E., Suter D. W., Beauchamp J. J., Efroymson R. A. (1999), ”Literature-derived bioaccumulation models for earthworms: Development and validation”, *Environ. Toxicol. Chem.* 18, s. 2110–2120.

(64) Schlosser H. J. och 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, s. 413–433.

(65) Schmelz R. och Collado R. (1999), ”*Enchytraeus luxuriosus sp*. nov., a new terrestrial oligochaete species (Enchytraeide, Clitellata, Annelida)”, *Carolinea* 57, s. 93–100.

▼M4

(66) Sims R. W. och Gerard B. M. (1985), ”Earthworms”, i Kermack D. M. och Barnes R. S. K. (Hrsg.), *Synopses of the British Fauna (New Series)* nr 31, 171 S, London, E. J. Brill/Dr. W. Backhuys.

(67) Sousa J. P., Loureiro S., Pieper S., Frost M., Kratz W., Nogueira A. J. A., Soares A.M. V. M. (2000), ”Soil and plant diet exposure routes and toxicokinetics of lindane in a terrestrial isopod”, *Environ. Toxicol. Chem.* 19, s. 2557–2563.

(68) Spacie A. och Hamelink J. L. (1982), ”Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish”, *Environ. Toxicol. Chem.* 1, s. 309–320.

(69) Stephenson G. L., Kaushik A., Kaushik N. K., Solomon K. R., Steele T., Scroggins R. P. (1998), ”Use of an avoidance-response test to assess the toxicity of contaminated soils to earthworms”, ingår i ”Advances in earthworm ecotoxicology”, Sheppard S., Bembridge J., Holmstrup M., Posthuma L. (red.), *Setac Press*, Pensacola, s. 67–81.

(70) Sterenborg I., Vork N. A., Verkade S. K., Van Gestel C. A. M., Van Straalen N. M. (2003), ”Dietary zinc reduces uptake but not metallothionein binding and elimination of cadmium in the springtail *Orchesella cincta”, Environ. Toxicol. Chemistry* 22, s. 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”, andra utgåvan, EPA 600/R-99/064, US Environmental Protection Agency, Duluth, MN, mars 2000.

(73) Van Brummelen T. C. och Van Straalen N. M. (1996), ”Uptake and elimination of benzo(a)pyrene in the terrestrial isopod *Porcellio scaber”, Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 31, s. 277–285.

(74) Van Gestel C. A. M. 1992), ”The influence of soil characteristics on the toxicity of chemicals for earthworms; a review”, i *Ecotoxicology of Earthworms* (red. Becker H., Edwards, P.J., Greig-Smith P. W. och Heimbach F.). Intercept Press, Andover (GB).

(75) Van Gestel C. A. och Ma W. C. (1990), ”An approach to quantitative structure-activity relationships (QSARs) in earthworm toxicity studies”, *Chemosphere* 21, s. 1023–1033.

(76) Van Straalen N. M., Donker M. H., Vijver M. G., van Gestel C. A. M. (2005), ”Bioavailability of contaminants estimated from uptake rates into soil invertebrates”, *Environmental Pollution* 136, s. 409–417.

(77) Venter J. M. och Reinecke A. J. (1988), ”The life-cycle of the compostworm *Eisenia fetida* (Oligochaeta)”, *South African J. Zool.* 23, s. 161–165.

(78) Vijver M. G., Vink J. P. M., Jager T., Wolterbeek H. T., van Straalen N. M., van Gestel C. A. M. (2005), ”Biphasic elimination and uptake kinetics of Zn and Cd in the earthworm *Lumbricus rubellus* exposed to contaminated floodplain soil”, *Soil Biol, Biochem*. 37, s. 1843–1851.

(79) Widianarko B. och Van Straalen N. M. (1996), ”Toxicokinetics-based survival analysis in bioassays using nonpersistent chemicals, *Environ. Toxicol. Chem.* 15, s. 402–406.

▼M4

Tillägg 1

DEFINITIONER

bioackumulering: ökningen av testkemikaliens koncentration i eller på en organism i förhållande till testkemikaliens koncentration i det omgivande mediet. Bioackumulering uppstår till följd av både biokoncentrations- och biomagnifieringsprocesser (se nedan).

biokoncentration: ökningen av testkemikaliens koncentration i eller på en organism till följd av upptagning av kemikalien som endast sker från det omgivande mediet (t.ex. via kroppsytan och förtärd jord) i förhållande till testkemikaliens koncentration i det omgivande mediet.

biomagnifiering: ökningen av testkemikaliens koncentration i eller på en organism, främst till följd av upptagning från förorenad föda eller förorenat byte, i förhållande till testkemikaliens koncentration i födan eller bytet. Biomagnifiering kan leda till överföring eller ackumulering av testämnet inom näringsvävar.

eliminering: eliminering av en testkemikalie betyder att kemikalien avlägsnas från testorganismens vävnad genom aktiva eller passiva processer som inträffar oberoende av om testämnet finns eller inte finns i det omgivande mediet.

bioackumuleringsfaktor (BAF): den koncentration av testkemikalien under valfri tidpunkt under upptagningsfasen som förekommer i eller på testorganismen (C_a uttryckt som g per kg torrvikt mask) dividerad med testkemikaliens koncentration i det omgivande mediet (C_s uttryckt som g per kg torrvikt jord); BAF uttrycks med enheten kg jord per kg mask.

bioackumuleringsfaktor vid stabilt tillstånd (BAF_{ss}): den BAF som gäller vid stabilt tillstånd och som inte förändras betydligt över en längre tidsperiod medan koncentrationen av testkemikalie i det omgivande mediet (C_s uttryckt som g per kg torrvikt jord) är konstant under denna tidsperiod.

kinetisk bioackumuleringsfaktor (BAF_K): de bioackumuleringsfaktorer som beräknas direkt från förhållandet mellan upptagningskonstant och elimineringskonstant (k_s och k_e, se nedan).

bioackumuleringsfaktor biota-jord (BSAF): den fettnormaliserade koncentrationen av testkemikalien i eller på testorganismen dividerad med den organiskt kol-normaliserade koncentrationen av testkemikalien vid stabilt tillstånd. C_a uttrycks som g per kg fettinnehåll i organismen och C_s som g per kg organiskt innehåll i jorden; BSAF har enheten kg organiskt kol per kg fett.

platå eller stabilt tillstånd: jämvikt råder mellan upptagnings- och elimineringsprocesser som inträffar samtidigt under exponeringsfasen. Stabilt tillstånd syns i kurvan över BAF mot tiden när kurvan blir parallell med tidsaxeln och tre på varandra följande analyser av BAF på prover som tagits med minst två dagars mellanrum ligger inom 20 % från varandra, och det inte finns några statistiskt signifikanta skillnader mellan de tre provtagningsperioderna. För testkemikalier som tas upp långsamt är det lämpligare med ett intervall på sju dagar (49).

fördelningskoefficienten organiskt kol-vatten (K_{oc}): förhållandet mellan en kemikalies koncentration i eller på jordens fraktion av organiskt kol och kemikaliens koncentration i vatten vid jämvikt.

fördelningskoefficienten oktanol-vatten (K_{ow}): förhållandet mellan en kemikalies löslighet i n-oktanol och i vatten vid jämvikt; uttrycks även som P_{ow}. Logaritmen av K_{ow} (log K_{ow}) används som indikator för en kemikalies potential för bioackumulering i vattenlevande organismer.

▼M4

upptagnings- eller exponeringsfasen: den tid under vilken testorganismerna är exponerade för testkemikalien.

upptagningskonstant (k_s): ett numeriskt värde som definierar hur snabbt koncentrationen av testämnet ökar i eller på testorganismen till följd av upptagning från jordfasen; k_s uttrycks som g jord per kg mask per dag.

elimineringsfas: den tid efter överföringen av testorganismerna från ett förorenat medium till ett medium som inte innehåller testämne, under vilken eliminering (eller nettoförlust) av kemikalien från testorganismerna studeras.

elimineringskonstant (k_e): det numeriska värde som definierar reduktionshastigheten för koncentrationen av testämne i eller på testorganismen efter överföring av testorganismerna från ett medium som innehåller testämnet till ett medium som inte innehåller testämnet; k_e uttrycks som d^{-1}.

testkemikalie: alla ämnen eller blandningar som testas med denna testmetod.

▼M4

Tillägg 2

Beräkning av upptagnings- och elimineringsparametrar

Den huvudsakliga endpointen för ett bioackumuleringstest är bioackumuleringsfaktorn BAF. Uppmätt BAF kan beräknas genom att dividera koncentrationen i testorganismen C_a med koncentrationen i jorden C_s vid stabilt tillstånd. Om stabilt tillstånd inte uppnås under upptagningsfasen beräknas BAF_K utifrån konstanterna i stället för utifrån BAF_{SS}. Det bör dock finnas en anmärkning om huruvida BAF är baserat på koncentrationer vid stabilt tillstånd eller inte.

Den vanliga metoden för att få fram kinetisk bioackumuleringsfaktor (BAF_K), upptagningskonstant (k_s) och elimineringskonstant (k_e) är att använda icke-linjära datorbaserade parameteruppskattningsmetoder, t.ex. baserade på de modeller som beskrivs i (68). Utifrån en viss uppsättning sekventiella tid-koncentrationsdata och modellekvationerna

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s(1 - e^{-k}e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{(ekvation 1)}$$

eller

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s(e^{-k}e^{(t-tc)} - e^{-k}e^{t}) \qquad t > t_c \qquad \text{(ekvation 2)}$$

där

C_a = koncentrationen kemikalie i maskar (g per kg våt- eller torrvikt)

k_s = upptagningshastigheten i vävnad (g jord per kg mask per dag)

C_s = koncentrationen kemikalie i jord (g per kg våt- eller torrvikt)

k_e = elimineringskonstant (d^{-1})

t_c = tidpunkten vid slutet av upptagningsfasen

beräknar dessa datorprogram värden för BAF_K, k_s och k_e.

Om bakgrundskoncentrationen i icke-exponerade maskar t.ex. på dag 0 avviker betydligt från noll (kan vara fallet t.ex. för metaller) bör denna bakgrundskoncentration $C_{a,0}$ införlivas i ekvationerna, enligt följande:

$$C_a = C_{a,0} + \frac{k_s}{k_e} \times C_s(1 - e^{-k}e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{(ekvation 3)}$$

och

$$C_a = C_{a,0} + \frac{k_s}{k_e} \times C_s(e^{-k}e^{(t-tc)} - e^{-k}e^{t}) \qquad t > t_c \qquad \text{(ekvation 4)}$$

Om en signifikant minskning av testkemikaliekoncentrationen i jorden kan observeras över tid under upptagningsfasen, kan följande modeller användas, t.ex. (67) (79):

$$C_s = C_0(e^{-k}0^{t}) \qquad \text{(ekvation 5)}$$

▼M4

där

C_s = kemikaliekoncentrationen i jorden (g per kg våt- eller torrvikt)

k_0 = sönderfallskonstant i jord (d^{-1})

C_0 = ursprunglig kemikaliekoncentration i jord (g per kg våt- eller torrvikt)

$$C_a = \frac{k_s}{k_e - k_0} \times (e^{-k_0 t} - e^{-k} e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{(ekvation 6)}$$

$$C_a = \frac{k_s}{k_e - k_0} \times e^{-k_0 tc} - e^{-k} e^{tc} * e^{-k(t-tc)} \qquad t > t_c \qquad \text{(ekvation 7)}$$

där

C_a = koncentrationen kemikalie i maskar (g per kg våt- eller torrvikt)

k_s = upptagningshastigheten i vävnad (g jord per kg mask per dag)

k_0 = sönderfallskonstant i jord (d^{-1})

k_e = elimineringskonstant (d^{-1})

t_c = tidpunkten vid slutet av upptagningsfasen.

Om stabilt tillstånd nås under upptagningsfasen (t.ex. $t = \infty$) kan ekvation 1

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s(1 - e^{-k} e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{(ekvation 1)}$$

reduceras till

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s$$

eller

$$C_a / C_s = k_s / k_e = BAF_K \qquad \text{(ekvation 8).}$$

Då är k_s/k_e x C_s en tillnärmning av testämneskoncentrationen i maskvävnad vid stabilt tillstånd ($C_{a,ss}$).

Ackumuleringsfaktorn biota-jord (BSAF) kan beräknas enligt följande:

$$BSAF = BAF_K * \frac{f_{oc}}{f_{lip}} \qquad \text{(ekvation 9)}$$

där f_{oc} är fraktionen organiskt kol i jorden och f_{lip} är fraktionen fett i maskar, båda helst bestämda på prover som tagits i testet och på grundval av torrvikt eller våtvikt.

Elimineringskinetiken kan modelleras med stöd av data från elimineringsfasen och med tillämpning av följande modellekvation och en datorstödd icke-linjär metod för modelluppskattning. Om datapunkterna plottade mot tiden indikerar en konstant exponentiell minskning av testämneskoncentrationen i djuren, kan en one-compartment-modell (ekvation 9) användas för att beskriva elimineringens tidsförlopp.

$$C_a(t) = C_{a,ss} \times e^{-k} e^{t} \qquad \text{(ekvation 10)}$$

▼M4

Elimineringsprocesserna verkar i bland ha två faser med en snabb minskning av C_a till en början och därefter en långsammare avgång av testämne senare under elimineringen, t.ex. (27) (68). De två faserna kan tolkas genom antagande om att det finns två olika enheter i organismen från vilka testämnet avgår med olika hastigheter. I sådana fall bör information inhämtas från specifik litteratur, t.ex. (38) (39) (40) (78).

Med användning av modellekvationerna ovan kan de kinetiska parametrarna k_s och k_e även kalkyleras i ett steg genom att samtidigt tillämpa modeller för första ordningens kinetik på alla data från både upptagnings- och elimineringsfasen. Beskrivning av en metod som ger möjlighet till en sådan kombinerad beräkning av upptagnings- och elimineringskonstanter kan sökas i hänvisningarna (41), (73) och (70).

$$C_a = \left[\frac{K_s}{K_e} \cdot C_s(1 - e^{-k_e t}) \times (m = 1)\right] + \left[\frac{K_s}{k_e} \times C_s(e^{-K_e(t-t_c)} - e^{-K_e t}) \times (m = 2)\right] \quad \text{(ekvation 11)}$$

Anmärkning: När upptagnings- och elimineringsparametrar uppskattas samtidigt utifrån kombinerade upptagnings- -och elimineringsdata är ”m” såsom visas i ekvation 11 en deskriptor som gör det möjligt för datorprogrammet att tilldela ekvationens subtermer till datauppsättningarna för respektive fas och göra utvärderingen korrekt (m = 1 för upptagningsfasen och m = 2 för elimineringsfasen).

Dessa modellekvationer bör dock användas med försiktighet, särskilt när det sker ändringar i testkemikaliens biotillgänglighet eller om (bio)nedbrytning sker under testet (se t.ex. (79)).

▼M4

Tillägg 3

EXEMPEL PÅ SCHEMAN FÖR TEST AV BIOACKUMULERING FRÅN JORDAR

Test med daggmaskar

a) Upptagningsfas med 8 provtagningsdatum som används för beräkning av kinetik.

Dag	Aktivitet
– 6	Konditionering av förberedd jord under 48 timmar.
– 4	Spikning av jordfraktionen med testkemikalielösning, avdunstning av eventuellt lösningsmedel, blandning av jordbeståndsdelarna, fördelning av jord i testkärlen och stabilisering till jämvikt under testbetingelserna i 4 dagar (3 veckor för metallspikad jord).
– 3 till – 1	Separation av testorganismerna från odlingen för acklimatisering, beredning och fuktning av jordbeståndsdelarna.
0	Mätning av temperatur och jordens pH, avlägsnande av jordprover från behandlade kärl och lösningsmedelskontroller för bestämning av testkemikaliens koncentration, tillsats av föda, vägning och slumpvis fördelning av maskarna till testkärlen med bibehållande av tillräckligt antal maskar för bestämning av analytiska bakgrundsvärden, våt- och torrvikt och fettinnehåll, vägning av alla testkärl för kontroll av jordens fukthalt och kontroll av lufttillförsel om stängda testsystem används.
1	Kontroll av lufttillförsel, registrering av maskarnas beteende och temperatur samt tagning av jord- och maskprover för bestämning av koncentrationen testämne.
2	Samma som dag 1.
3	Kontroll av lufttillförsel, maskarnas beteende och temperatur.
4	Samma som dag 1.
5–6	Samma som dag 3.
7	Samma som dag 1: tillförsel av föda, kontroll av jordens fukthalt genom vägning av testkärlen och vattenpåfyllnad motsvarande avdunstningen.
8–9	Samma som dag 3.
10	Samma som dag 1.
11–13	Samma som dag 3.
14	Samma som dag 1: tillförsel av föda, kontroll av jordens fukthalt genom vägning av testkärlen och vattenpåfyllnad motsvarande avdunstningen.
15–16	Samma som dag 3.
17	Samma som dag 1.
18–20	Samma som dag 3.

▼**M4**

Dag	Aktivitet
21	Samma som dag 1: mätning av temperatur och jordens pH, kontroll av jordens fukthalt genom vägning av testkärlen, slut på upptagningsfasen, överföring av maskarna från återstående exponerade replikat till kärl som innehåller ren jord för elimineringsfasen (ingen tarmtömning) samt provtagning av jord och maskar från lösningsmedelskontrollerna.
	Aktiviteterna före exponering (stabiliseringsfasen) bör tidplaneras med beaktande av testkemikaliens egenskaper.
	Aktiviteterna för dag 3 bör genomföras dagligen (åtminstone på arbetsdagar).

b) Elimineringsfas

Dag	Aktivitet
– 6	Beredning och fuktning av jordens beståndsdelar samt konditionering av beredd jord i 48 timmar.
– 4	Blandning av jordens beståndsdelar, fördelning av jord till testkärlen och inkubation under testbetingelserna i 4 dagar.
0 (upptagningsfasens slut)	Mätning av temperatur och jordens pH, vägning och slumpmässig fördelning av maskar till testkärlen, tillförsel av föda, överföring av maskar från återstående exponerade replikat till kärl som innehåller ren jord samt tagning av jord- och maskprover efter 4–6 timmar för bestämning av testkemikaliens koncentration.
1	Kontroll av lufttillförsel, registrering av maskarnas beteende och temperatur samt tagning av jord- och maskprover för bestämning av testkemikaliens koncentration.
2	Samma som dag 1.
3	Kontroll av lufttillförsel, maskarnas beteende och temperatur.
4	Samma som dag 1.
5–6	Samma som dag 3.
7	Samma som dag 1: tillförsel av föda, kontroll av jordens fukthalt genom vägning av testkärlen och vattenpåfyllnad motsvarande avdunstningen.
8–9	Samma som dag 3.
10	Samma som dag 1.
11–13	Samma som dag 3.
14	Samma som dag 1: tillförsel av föda, kontroll av jordens fukthalt genom vägning av testkärlen och vattenpåfyllnad motsvarande avdunstningen.
15–16	Samma som dag 3.
17	Samma som dag 1.

▼M4

Dag	Aktivitet
18–20	Samma som dag 3.
21	Samma som dag 1: mätning av temperaturen och jordens pH, kontroll av jordens fuktighet genom vägning av testkärlen samt tagning av jord- och maskprover från lösningsmedelskontrollerna.
	Beredning av jorden före elimineringsfasens början bör göras på samma sätt som beredningen före upptagningsfasen.
	Aktiviteterna för dag 3 bör genomföras dagligen (åtminstone på arbetsdagar).

Test med enchytraeider

a) Upptagningsfas med 8 provtagningsdatum som används för beräkning av kinetik.

Dag	Aktivitet
– 6	Konditionering av förberedd jord under 48 timmar.
– 4	Spikning av jordfraktionen med testkemikalielösning, avdunstning av eventuellt lösningsmedel, blandning av jordbeståndsdelarna, fördelning av jord i testkärlen och stabilisering till jämvikt i testbetingelserna i 4 dagar (3 veckor för metallspikad jord).
– 3 till – 1	Separation av testorganismerna från odlingen för acklimatisering, beredning och fuktning av jordbeståndsdelarna.
0	Mätning av temperatur och jordens pH, avlägsnande av jordprover från behandlade kärl och lösningsmedelskontroller för bestämning av testkemikaliens koncentration, tillsats av föda till jorden, vägning och slumpvis fördelning av maskarna till testkärlen med bibehållande av tillräckligt antal maskar för bestämning av analytiska bakgrundsvärden, våt- och torrvikt och fettinnehåll, vägning av alla testkärl för kontroll av jordens fukthalt och kontroll av lufttillförsel om stängda testsystem används.
1	Kontroll av lufttillförsel, registrering av maskarnas beteende och temperatur samt tagning av jord- och maskprover för bestämning av koncentrationen testämne.
2	Samma som dag 1.
3	Kontroll av lufttillförsel, maskarnas beteende och temperatur.
4	Samma som dag 1.
5–6	Samma som dag 3.
7	Samma som dag 1: tillförsel av föda till jorden, kontroll av jordens fukthalt genom vägning av testkärlen och vattenpåfyllnad motsvarande avdunstningen.
9	Samma som dag 1.
10	Samma som dag 3.

▼**M4**

Dag	Aktivitet
11	Samma som dag 1.
12–13	Samma som dag 3.
14	Samma som dag 1: tillförsel av föda till jorden, mätning av temperaturen och jordens pH, kontroll av jordens fukthalt genom vägning av testkärlen; slut på upptagningsfasen; överföring av maskarna från återstående exponerade replikat till kärl som innehåller ren jord för elimineringsfasen (ingen tarmtömning) samt provtagning av jord och maskar från lösningsmedelskontrollerna.
	Aktiviteterna före exponering (stabiliseringsfasen) bör tidplaneras med beaktande av testkemikaliens egenskaper.
	Aktiviteterna för dag 3 bör genomföras dagligen (åtminstone på arbetsdagar).

▼M4

Tillägg 4

Syntetisk jord – rekommendationer för beredning och lagring

Eftersom naturjordar från en viss källa inte alltid finns att tillgå under hela året, och ingående organismer och mikroföroreningar kan påverka testet, rekommenderas syntetiskt substrat, syntetisk jord enligt kapitel C.8 i denna bilaga, Toxicitet för daggmaskar (48), för användning i detta test. Flera olika testarter kan överleva, växa och föröka sig i denna jord, och den ger också maximal standardisering såväl som jämförbarhet inom och mellan laboratorier och odlingsbetingelser.

Jordens beståndsdelar

Torv:	10 %	Sphagnum-torv, enligt OECD:s riktlinje 207 (48)
Kvartssand:	70 %	Industriell kvartssand (lufttorkad), minst 50 % av partiklarna bör ha en storlek inom området 50–200 μm, men alla partiklar bör vara ≤ 2 mm
Kaolinitlera:	20 %	Kaolinithalt ≥ 30 %
Kalciumkarbonat:	≤ 1 %	$CaCO_3$, pulveriserat, kemiskt rent

Alternativt kan jordens organiska kolhalt minskas, t.ex. genom att sänka torvhalten till 4–5 % av torrjord och öka sandhalten i motsvarande grad. Med en sådan minskning av halten organiskt kol kan möjligheterna till adsorption av testkemikalien till jorden (organiskt kol) minskas, och då blir testkemikalien bättre tillgänglig för maskarna (74). Det har demonstrerats att *Enchytraeus albidus* och *Eisenia fetida* kan uppfylla validitetskriterierna för reproduktion vid testning i fältjordar med lägre halt organiskt kol, t.ex. 2,7 % (33), (61), och det finns erfarenheter som visar att detta också kan uppnås i syntetisk jord med 5 % torv.

Beredning

Jordens torra beståndsdelar blandas omsorgsfullt (t.ex. i en storskalig laboratorieblandare). Detta bör göras cirka en vecka innan testet inleds. De blandade torra jordbeståndsdelarna bör fuktas med avjoniserat vatten minst 48 timmar före applicering av testämnet för att nå surhetsjämvikt. För bestämning av pH används en blandning av jord och 1 M lösning av KCl i förhållandet 1:5. Om pH-värdet inte ligger inom rekommenderat område (6,0 ± 0,5) bör tillräcklig mängd $CaCO_3$ tillföras jorden eller så måste en ny sats jord beredas.

Den syntetiska jordens maximala vattenhållningskapacitet (WHC) bestäms enligt ISO 11268-2 (35). Minst två dagar innan testet inleds fuktas den torra syntetiska jorden med tillräcklig mängd avjoniserat eller rekonstituerat vatten till en vattenhalt som motsvarar cirka hälften av den slutliga vattenhalten. Den slutliga vattenhalten bör vara cirka 40–60 % av maximal vattenhållningskapacitet (WHC). Vid teststart ska den förhandsfuktade jorden delas upp i lika många delar som antalet testkoncentrationer och kontroller som används för testet, och fukthalten justeras till 40–60 % av WHC_{max} genom användning av en lösning av testämnet och/eller genom tillförsel av avjoniserat eller rekonstituerat vatten. Fukthalten bestäms i början och i slutet av testet (vid 105 °C). Fukthalten bör vara optimal för den art som testas (fukthalten kan också kontrolleras genom att försiktigt krama jorden i handen och då bör det komma fram små vattendroppar mellan fingrarna).

▼M4

Förvaring

De torra beståndsdelarna av syntetisk jord kan förvaras i rumstemperatur fram till användningen. Den förberedda förfuktade jorden kan förvaras i svalt utrymme i upp till tre dagar före spikningen, och vattenavdunstningen bör minimeras. Jord som spikats med testämne bör användas omedelbart, med undantag för om det finns information om att jorden i fråga kan förvaras utan att testämnets toxicitet och biotillgänglighet påverkas. Prover av spikad jord kan sedan förvaras i de förhållanden som rekommenderas för testsystemet i fråga fram till analys.

▼M4

Tillägg 5

Arter av jordlevande oligochaeter som rekommenderas för testning av bioackumulering från jord

Daggmaskar

Rekommenderad testart är *Eisenia fetida* (Savigny 1826), som tillhör familjen Lumbricidae. Från och med 1972 är den uppdelad i två underarter (*Eisenia fetida* och *Eisenia andrei* (10)). Enligt Jaenike (36) är dessa äkta, separata arter. *Eisenia fetida* känns lätt igen genom de klargula banden mellan segmenten medan *Eisenia andrei* har en enhetlig mörkröd färg. De härstammar sannolikt från Svartahavsregionen och finns numera över hela världen, särskilt i antropogent modifierade livsmiljöer såsom komposthögar. Båda kan användas för både ekotoxikologiska test och bioackumuleringstest.

Eisenia fetida och *Eisenia andrei* säljs allmänt på marknaden, t.ex. som fiskbete. Jämfört med andra daggmaskar (familjen Lumbricidae) har de en kort livscykel och når vuxenstadiet inom cirka 2–3 månader (vid rumstemperatur). Den optimala temperaturen för dessa daggmaskar ligger kring 20–24 °C. De föredrar relativt fuktiga substrat med nästan neutralt pH och en hög halt av organiskt material. Dessa arter har använts i stor utsträckning i standardiserade ekologiska tester i cirka 25 år och odling av dem är därför väl etablerad (48) (77).

Båda arterna kan odlas i ett stort urval djuravfall. Som odlingsmedium rekommenderas enligt ISO (35) en 50/50-blandning av häst- eller boskapsgödsel och torv. Mediet bör ha pH på cirka 6–7 (reglerat med kalciumkarbonat), låg jonisk konduktivitet (lägre än 6 mS/cm eller en salthalt under 0,5 %) bör inte ha för hög halt av ammoniak eller animaliskt urin. Likaså kan man använda kommersiell trädgårdsjord fri från tillsatser eller syntetisk jord enligt OECD (48) eller en 50/50-blandning av båda. Substratet bör vara fuktigt men inte för vått. Lämplig storlek på odlingslådorna är 10–50 liter.

För att få maskar med standardålder och standardmassa är det bäst att inleda odlingen med kokonger. För detta tillsätts vuxna maskar till en odlingslåda med färskt substrat för att de ska producera kokonger. Erfarenheterna har visat att en populationsdensitet på cirka 100 vuxna maskar per kg substrat (våtvikt) ger goda förökningsnivåer. Efter 28 dagar avlägsnas de vuxna maskarna. Daggmaskarna som kläckts ur kokonger används för testning när de har nått vuxenstadium efter minst 2 månader men högst 12 månader.

Maskar av de arter som beskrivs ovan kan anses vara friska om de rör sig genom substratet, inte försöker lämna substratet och förökar sig kontinuerligt. Mycket långsamma rörelser eller gul bakre del (i fråga om *Eisenia fetida*) tyder på utarmat substrat. Då rekommenderas färskt substrat och/eller mindre antal djur per låda.

Valda ytterligare hänvisningar

Gerard B. M. (1964), *Synopsis of the British fauna*, nr 6 Lumbricidae, *Linnean Soc.* London, 6, s. 1–58.

Graff O. (1953), ”Die Regenwürmer Deutschlands”, *Schr. Forsch. Anst. Landwirtsch.* 7, s. 1–81.

Römbke J. E., Egeler P., Füll C. (1997), ”Literaturstudie über Bioakkumulationstests mit Oligochaeten im terrestrischen Medium”, *Bericht für das UBA*, F + E 206 03 909, 86 S.

Rundgren S. (1977), ”Seasonality of emergence in lumbricids in southern Sweden”, *Oikos* 28, s. 49–55.

Satchell J. E. (1955), ”Some aspects of earthworm ecology”, *Soil Zoology (Kevan)*, s. 180–201.

▼M4

Sims R. W. och Gerard B. M. (1985), ”A synopsis of the earthworms”, *Linnean Soc. London*, 31, s. 1–171.

Tomlin A. D. (1984), ”The earthworm bait market in North America”, ingår i ”Earthworm Ecology - from Darwin to vermiculture”. Satchell, J.E. (red.), Chapman & Hall, London, s. 331–338.

Enchytraeider

Den rekommenderade testarten är *Enchytraeus albidus* Henle 1837 (vit ringmask). *Enchytraeus albidus* är en av de största arterna (upp till 15 mm) bland ringmaskar (Annelida) i Oligochaetfamiljen Enchytraeidae och finns över hela världen, se t.ex. (8). *Enchytraeus albidus* finns i marina och limniska livsmiljöer och livsmiljöer på land, främst i multnande organiskt material (tång, kompost) men är sällsynt på ängar (42). Denna breda ekologiska tolerans och vissa morfologiska variationer tyder på att det kan finnas olika raser av denna art.

Enchytraeus albidus säljs allmänt på marknaden som fiskfoder. Kontroll bör göras av om odlingen är förorenad av andra, i regel mindre arter (60). Om förorening förekommer bör alla maskar tvättas med vatten i en petriskål. Stora vuxna exemplar av *Enchytraeus albidus* väljs sedan ut (med användning av stereomikroskop) för start av en ny odling. Alla andra maskar kasseras. Livscykeln är kort eftersom maskarna blir könsmogna mellan 33 dagar (vid 18 °C) och 74 dagar (vid 12 °C). Endast odlingar som har hållits i laboratoriet minst 5 veckor (en generation) utan problem får användas för testning.

Även andra arter av *Enchytraeus* är lämpliga, särskilt *Enchytraeus luxuriosus.* Denna art är en äkta jordlevande mask, vilket nyligen har beskrivits i (65). Om andra arter av *Enchytraeus* används bör de identifieras tydligt och rapporten bör innehålla motivering för valet av denna art.

Enchytraeus crypticus (Westheide & Graefe 1992) är en art som tillhör samma grupp som *Enchytraeus luxuriosus*. Man har inte med säkerhet kunna bekräfta dess existens på fältet, eftersom den endast har beskrivits utifrån daggmaskodlingar och komposthögar (Römbke 2003). Artens ursprungliga ekologiska krav är därför inte kända. Nyligen gjorda laboratoriestudier av olika slags fältjordar har dock bekräftat att denna art har en bred tolerans när det gäller jordegenskaper som pH och textur (Jänsch m.fl. 2005). Under de senaste åren har denna art ofta använts i ekotoxikologiska studier eftersom den är lätt att odla och testa(se t.ex. Kuperman m.fl. 2003). Den är dock liten (3–12 mm, i genomsnitt 7 mm, Westheide & Müller 1996), vilket gör hanteringen svårare i jämförelse med *Enchytraeus albidus*. När denna art används i stället för *Enchytraeus albidus*, kan storleken på testkärlen vara mindre, men det är inget krav. Dessutom bör man beakta att arten förökar sig mycket snabbt med en generationstid på mindre än 20 dagar vid 20 ± 2 °C (Achazi m.fl. 1999) och ännu snabbare vid högre temperaturer.

Enchytraeider av arten *Enchytraeus albidus* (såväl som andra *Enchytraeus*-arter) kan odlas i stora plastlådor (t.ex. 30 × 60 × 10 cm eller 20 × 12 × 8 cm, som lämpar sig för odling av små maskar) fyllda med en blandning av syntetisk jord och allmänt tillgänglig oförorenad trädgårdsjord utan tillsatser. Kompostmaterial bör undvikas eftersom det kan innehålla giftiga kemikalier såsom tungmetaller. Fauna bör avlägsnas från odlingsjorden före användning genom djupfrysning i tre omgångar. Rent syntetisk jord kan också användas men då kan förökningshastigheten vara lägre jämfört med blandade substrat. Substratet bör ha pH 6,0 ± 0,5. Odlingen hålls i en inkubator vid 15 ± 2 °C utan ljus. Under alla omständigheter ska temperaturer över 23 °C undvikas. Jorden (syntetisk eller naturlig) ska vara fuktig men inte våt. När jorden kramas försiktigt i handen ska endast små vattendroppar komma fram. Under alla omständigheter bör anoxiska betingelser undvikas (om t.ex. lock används, bör det ha tillräckligt antal hål för att ge tillräcklig luftväxling). Odlingsjorden bör luftas genom försiktig omblandning en gång per vecka.

▼M4

Maskarna bör utfodras minst en gång per vecka ad libitum med havreflingor som placeras i en kavitet på jordens yta och täcks med jord. Om det finns kvar foder från föregående utfodring bör mängden foder justeras i motsvarande grad. Om det växer svamp på överblivet foder bör det ersättas med en ny mängd havreflingor. För att stimulera förökningen kan havreflingorna kompletteras med allmänt tillgängligt vitaminberikat proteinpulver varannan vecka. Efter tre månader överförs djuren till en färsk kultur eller färskt odlingssubstrat. Havreflingorna ska förvaras i kärl med tättslutande lock och bör behandlas i autoklav eller hettas upp före användning för att undvika infektion med mjölkvalster (t.ex. *Glyzyphagus* sp., Astigmata, Acarina) eller rovkvalster (t.ex. *Hypoaspis (Cosmolaelaps) miles*, Gamasida, Acarina). Efter desinfektering mals fodret så att det enkelt kan spridas på jordytan. En annan tänkbar foderkälla är bakningsjäst eller fiskfoder Tetra-Min®.

Allmänt taget gäller att odlingsbetingelserna är tillräckliga om maskarna inte försöker lämna substratet, rör sig snabbt genom jorden, har en glansig yta utan vidhäftande jordpartiklar, har en mer eller mindre vitaktig färg och det går att iaktta maskar av olika åldrar. Dessutom kan maskarna anses vara friska om de förökar sig kontinuerligt.

Valda ytterligare hänvisningar

Achazi R. K., 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, s. 117–126.

Jänsch S., Amorim M. J. B., Römbke J. (2005), ”Identification of the ecological requirements of important terrestrial ecotoxicological test species”, *Environ. Reviews* 13, s. 51–83.

Kuperman R. G., Checkai R. T., Simini M., Phillips C. T., Kolakowski J. E., Kurnas C. W., Sunahara G. I. (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, s. 651–656.

Römbke J. (2003), ”Ecotoxicological laboratory tests with enchytraeids: A review”, *Pedobiologia* 47, s. 607–616.

Westheide W. och Graefe U. (1992), ”Two new terrestrial *Enchytraeus* species (Oligochaeta, Annelida)”, *J. Nat. Hist.* 26, s. 479–488.

Westheide W. och Müller M. C. (1996), ”Cinematographic documentation of enchytraeid morphology and reproductive biology”, *Hydrobiologia* 334, s. 263–267.

▼M6

C.31 TEST PÅ LANDVÄXTER: TEST AV GRODDPLANTORS UTVECKLING OCH TILLVÄXT

INLEDNING

1. Denna testmetod motsvarar OECD:s testriktlinje (TG) 208 (2006). Testmetoder ses regelbundet över med avseende på den vetenskapliga utvecklingen och tillämpligheten för lagstadgad användning. Syftet med denna uppdaterade testmetod är att bedöma de potentiella effekterna av kemikalier på groddplantors utveckling och tillväxt. Den omfattar inte kroniska effekter eller effekter på fortplantningen (dvs. fröproduktion, blomning, fruktmognad). Exponeringsförhållandena och testkemikaliens egenskaper måste beaktas för att säkerställa att lämpliga testmetoder används (t.ex. då man testar metaller eller metallföreningar bör man beakta effekterna av pH och tillhörande motjoner) (1). Denna testmetod omfattar inte plantor som utsätts för kemiska ångor. Testmetoden kan användas för kontroll av allmänna kemikalier, biocider och växtskyddsmedel (dvs. bekämpningsmedel). Den har utarbetats på grundval av befintliga metoder (2) (3) (4) (5) (6) (7). Andra hänvisningar som gäller växttester beaktades också (8) (9) (10). De definitioner som används återfinns i tillägg 1.

PRINCIP FÖR TESTMETODEN

2. Testet utgör en utvärdering av effekterna på utvecklingen och tillväxten av högre växters groddplantor efter att de har exponerats för testkemikalien i jord (eller annan lämplig jordmatris). Fröna placeras i kontakt med jord som behandlats med testkemikalien och utvärderas i regel efter 14–21 dagar efter det att 50 % av plantorna i kontrollgruppen har grott. Som endpoints används visuell bedömning av fröplantornas grodd, groddarnas torrvikt (alternativt färskvikt) och i vissa fall groddarnas höjd, samt en bedömning av synliga skadliga effekter på plantans olika delar. Dessa mätningar och observationer jämförs med dem som görs på obehandlade kontrollväxter.

3. Beroende på den förväntade exponeringsvägen blandas testkemikalien antingen ner i jorden (eller eventuellt i en syntetisk jordmatris) eller appliceras ovanpå jorden, vilket i båda fallen är lämpliga motsvarigheter för kemikaliens potentiella exponeringsvägar. Iblandning i jord sker genom att behandla jord i större partier. Efter iblandningen av kemikalien överförs jorden till krukor, och därefter planteras de växtarter som ska testas i jorden. Applicering ovanpå jorden ska göras i krukor i vilka fröna redan har planterats. Testenheterna (dvs. kontroller samt behandlad jord och frön) placeras sedan under förhållanden som främjar växternas grobarhet och tillväxt.

4. Testet kan utföras för att fastställa dos-respons-kurvan, eller som ett toleranstest vid en enda koncentration/frekvens beroende på syftet med studien. Om resultaten från testet med en enda koncentration/frekvens överskrider en viss toxicitetsnivå (t.ex. om effekter större än x % observeras), ska ett preliminärt test utföras för att fastställa toxicitetens övre och nedre gränser, följt av ett test med flera olika koncentrationer/frekvenser för att generera en dos-responskurva. En lämplig statistisk analys används för att erhålla den effektiva koncentrationen EC_x eller den effektiva appliceringsfrekvensen ER_x (t.ex. EC_{25}, EC_{50}, ER_{25}, ER_{50}) för den/de känsligaste parametern/parametrarna som är av intresse. Den högsta koncentrationen utan observerad effekt (NOEC) och den lägsta koncentrationen med observerad effekt (LOEC) kan också beräknas i detta test.

INFORMATION OM TESTKEMIKALIEN

5. Följande information är användbar för identifiering av förväntad exponeringsväg för kemikalien och vid utformningen av testet: strukturformel,

▼M6

renhetsgrad, vattenlöslighet, löslighet i organiska lösningsmedel, fördelningskoefficient 1-oktanol/vatten, sorptionsegenskaper i jord, ångtryck, kemisk stabilitet i vatten och ljus, samt bionedbrytbarhet.

TESTETS GILTIGHET

6. För att testet ska anses vara giltigt måste följande kriterier uppfyllas för kontrollerna:

— Fröplantornas grobarhet ska vara minst 70 %.

— Fröplantorna får inte uppvisa synliga fytotoxiska effekter (t.ex. kloros, nekros, vissning, deformerade blad och stjälkar), och plantorna ska uppvisa normala variationer i tillväxt och morfologi för den berörda arten.

— Den genomsnittliga överlevnaden för grodda fröplantor i kontrollerna är minst 90 % under testets gång.

— Miljöförhållandena för en viss art ska vara identiska och växtmedierna ska innehålla samma mängd jordmatris, stödmedier eller substrat från samma källa.

REFERENSKEMIKALIE

7. Ett referensämne kan testas regelbundet för att kontrollera att testets utförande, de aktuella testplantornas respons och provningsvillkoren inte förändrats nämnvärt under testets gång. Alternativt kan mätningshistoriken för biomassa eller tillväxt i kontrollerna användas för att utvärdera testsystemets prestanda vid ett särskilt laboratorium, och kan då fungera som en åtgärd för intern kvalitetskontroll.

BESKRIVNING AV TESTMETODEN

Naturlig jord – artificiellt substrat

8. Växter kan odlas i krukor med lerig sand, sandjord eller sandig lättlera som innehåller upp till 1,5 % organiskt kol (ca 3 % organiskt material). Kommersiell planteringsjord eller syntetisk jord som innehåller upp till 1,5 % organiskt kol kan också användas. Lerjord bör inte användas om testkemikalien är känd för att ha en hög affinitet för lera. Jord tagen på fältet bör siktas till 2 mm partikelstorlek i syfte att homogenisera den och avlägsna grova partiklar. Typ och textur, procentandel organiskt kol, pH-värde och salthalt såväl som den elektroniska värmeledningsförmågan i den färdigberedda jorden ska rapporteras. Jorden bör klassificeras enligt ett enhetligt klassificeringssystem (11). Jorden kan pastöriseras eller värmebehandlas i syfte att minska effekterna av patogener.

9. Naturlig jord kan försvåra tolkningen av resultaten och öka variabiliteten på grund av olika fysikaliska/kemiska egenskaper och populationer av mikroorganismer. Dessa variabler påverkar i sin tur vattenbindningsförmågan, förmågan att binda kemikalier, luftningen och innehållet av näringsämnen och spårelement. Utöver skillnaderna i dessa fysikaliska faktorer finns det även skillnader när det gäller kemiska egenskaper såsom pH och redoxpotential, som kan påverka testkemikaliens biotillgänglighet (12) (13) (14).

10. Artificiella substrat används normalt inte för testning av bekämpningsmedel, men de kan användas för testning av allmänna kemikalier eller om man vill minimera variabiliteten i naturliga jordar och förbättra jämförbarheten i analysresultaten. De substrat som används bör bestå av inaktivt material som minimerar interaktionen med testkemikalien, lösningsmedlet, eller båda. Syratvättad kvartssand, mineralull och glaspärlor (t.ex. 0,35–0,85 mm i diameter) har konstaterats vara lämpliga inaktiva material som absorberar testkemikalien i lägsta möjliga grad (15) och gör det möjligt för fröplantan att ta upp

▼M6

största möjliga mängd av kemikalien via rötterna. Olämpliga substrat inbegriper vermikulit, perlit eller andra högabsorberande material. Näringsämnen för växternas tillväxt bör tillhandahållas för att se till att plantorna inte utsätts för stress på grund av näringsbrist, och om möjligt bör detta bedömas genom kemisk analys eller visuell bedömning av kontrollplantorna.

Kriterier för urvalet av testarter

11. De arter som valts ut ska vara tillräckligt omfattande, t.ex. med tanke på deras taxonomiska mångfald inom växtriket, deras utbredning, mängd, artspecifika livscykelegenskaper och naturligt förekomstområde, så att en rad olika reaktioner uppstår(8) (10) (16) (17) (18) (19) (20). Följande egenskaper hos eventuella testarter bör beaktas vid urvalet:

— arten har likformiga frön som lätt kan erhållas från tillförlitliga standardutsädeskällor och som har enhetlig, tillförlitlig och jämn grobarhet, liksom en enhetlig planttillväxt,

— plantan kan enkelt laboratorietestas, och kan ge tillförlitliga och reproducerbara resultat inom och mellan provningsanläggningar,

— känsligheten hos den art som testas bör överensstämma med reaktionen hos växter i miljön som exponeras för kemikalien,

— arterna har i viss utsträckning använts i tidigare toxicitetstester, och deras användning exempelvis i bioanalyser av herbicider, undersökningar av tungmetaller, stresstester med salthalt eller mineraler eller allelopatistudier visar på känslighet för många olika stressfaktorer,

— de är kompatibla med testmetodens tillväxtförutsättningar,

— de uppfyller giltighetskriterierna för testet.

Vissa av de historiskt sett mest använda testarterna förtecknas tillägg 2 och potentiella växtarter som inte är grödor i tillägg 3.

12. Det antal arter som ska testas beror på de tillämpliga lagstadgade kraven, och därför anges detta inte i denna testmetoden.

Applicering av testkemikalien

13. Kemikalien ska appliceras via en lämplig vehikel (t.ex. vatten, aceton, etanol, polyetylenglykol, gummi arabicum, sand). Blandningar (sammansatta produkter eller beredningar) som innehåller olika aktiva substanser och hjälpämnen kan också testas.

Iblandning i jord/artificiellt substrat

14. Kemikalier som är vattenlösliga eller suspenderade i vatten kan tillsättas i vatten, och lösningen kan sedan blandas med jord med en lämplig blandningsanordning. Denna typ av test kan vara lämplig om exponering för kemikalien sker via jord eller jordens porvatten och man oroar sig för plantans upptagning av kemikalien genom rötterna. Jordens vattenbindningsförmåga bör inte överskridas genom tillsättning av testkemikalien. Den mängd vatten som tillsatts ska vara samma för varje testkoncentration, men bör begränsas för att förhindra att jorden klumpar ihop sig.

▼M6

15. Ämnen med låg vattenlöslighet bör lösas upp i ett lämpligt flyktigt lösningsmedel (t.ex. aceton, etanol) och blandas med sand. Lösningsmedlet kan därefter avlägsnas från sanden med hjälp av en luftström medan sanden ständigt blandas. Den behandlade sanden blandas med testjorden. En andra kontroll bereds med endast sand och lösningsmedel. Lika stora mängder sand, med lösningsmedel som blandas i och avlägsnas, tillsätts alla behandlingsnivåer och den andra kontrollen. För fasta, olösliga testkemikalier blandas torr jord med kemikalien i en lämplig blandare. Därefter fylls krukorna med jord och fröna sås omedelbart.

16. När ett artificiellt substrat används i stället för jord kan kemikalier som är lösliga i vatten upplösas i näringslösningen strax innan testet inleds. Kemikalier som är olösliga i vatten, men som kan suspenderas i vatten med hjälp av ett lösningsmedel, bör tillsättas näringslösningen med bärämnet. Icke vattenlösliga kemikalier, för vilka det inte finns något giftfritt vattenlösligt bärämne, bör lösas i ett lämpligt flyktigt lösningsmedel. Lösningen blandas med sand eller glaspärlor, placeras i en vacuumrotationsapparat och evaporeras, vilket gör att sanden eller glaspärlorna täcks med ett jämnt lager av kemikalien. En vägd andel pärlor bör extraheras med samma organiska lösningsmedel och testkemikalien innan krukorna fylls.

Applicering på ytan

17. För växtskyddsprodukter appliceras testkemikalien ofta genom att jordytan besprutas med provlösningen. All utrustning som används i testerna, inklusive utrustning som används för att bereda och tillföra testkemikalien, bör ha sådan utformning och kapacitet att testerna där denna utrustning används kan genomföras på ett korrekt sätt och ger en reproducerbar täckning. Täckningen bör vara enhetlig på alla jordytor. Man bör undvika att kemikalierna adsorberas till eller reagerar med utrustningen (t.ex. plaströr och lipofila kemikalier eller delar av stål). Testkemikalien sprutas på jordytan på ett sätt som simulerar besprutning med typiska besprutningsbehållare. I allmänhet bör besprutningsvolymerna motsvara normal jordbruksprаxis och volymerna (mängd vatten etc.) bör rapporteras. Munstyckets typ bör väljas ut för att ge en jämn täckning av jordytan. Om lösningsmedel och bärämnen används bör en andra grupp kontrollplantor etableras som endast besprutas med lösningsmedlet eller bärämnet. Detta är inte nödvändigt för växtskyddsprodukter som testas som beredningar.

Kontroll av testkemikaliens koncentration/dos

18. Koncentrationerna och appliceringsdosen måste bekräftas genom en lämplig analytisk kontroll. För lösliga kemikalier kan alla koncentrationer/doser bekräftas genom en analys av testlösningen med den högsta koncentrationen som används för testet och med dokumentering av senare utspädning och användning av kalibrerad appliceringsutrustning (t.ex. kalibrerade glaskärl för analys, kalibrerad besprutningsutrustning). För olösliga kemikalier måste en kontroll av ämnen som består av föreningar kompletteras med vikten av den testkemikalie som tillförs jorden. Om homogeniteten måste påvisas kan det bli nödvändigt att göra en analys av jorden.

FÖRFARANDE

Testupplägg

19. Frön av samma arter planteras i krukor. Antalet frön per kruka beror på arten, krukstorleken och testets varaktighet. Antalet plantor per kruka bör inte vara större än att det finns lämpliga förutsättningar för tillväxt och att man undviker trängsel under hela testet. Högsta tillåtna planteringstäthet är

▼M6

cirka 3–10 frön per 100 cm^2 beroende på frönas storlek. Till exempel är det lämpligt att ha en till två plantor av majs, sojabönor, tomat, gurka eller sockerbetor per 15 cm behållare, tre plantor av raps eller ärtor per 15 cm behållare, och fem till tio plantor av lök, vete eller andra små frön per 15 cm behållare. Antalet frön och replikatkrukor (replikatet definieras som en kruka, vilket betyder att plantor i samma kruka inte utgör ett replikat) bör vara lämpligt för att en optimal statistisk analys ska kunna utföras (21). Det bör noteras att variabiliteten blir större för arter med färre stora frön per kruka (replikat) jämfört med arter där det är möjligt att använda ett större antal små frön per kruka. Genom att plantera lika många frön i varje kruka kan denna variabilitet minimeras.

20. Kontrollgrupperna används för att säkerställa att observerade effekter endast kan länkas till eller tillskrivas exponering för testkemikalien. En lämplig kontrollgrupp bör vara identisk i alla avseenden med testgruppen med undantag för exponeringen för testämnet. I ett givet test ska alla testplantor inklusive kontrollerna komma från samma källa. För att förhindra systematiska avvikelser måste en slumpmässig anvisning av test- och kontrollkrukor göras.

21. Frön som behandlats med en insekticid eller fungicid (dvs. behandlade frön) bör undvikas. Användningen av vissa icke-systemiska kontaktfungicider (t.ex. kaptan, tiram) är dock tillåten enligt vissa tillsynsmyndigheter (22). Om utsädesburna patogener utgör ett problem får fröna kortvarigt doppas i en svag 5-procentig hypokloritlösning och sedan tvättas noggrant i rinnande vatten och torkas. Ingen efterbehandling med andra bekämpningsmedel är tillåten.

Testbetingelser

22. Testförhållandena ska likna de nödvändiga förhållandena för normal tillväxt för de arter och sorter som testas (i tillägg 4 finns exempel på testförhållanden). De groende plantorna bör hållas enligt god odlingspraxis i miljökammare, fytotroner eller växthus. När man använder dessa drivanläggningar omfattar denna praxis vanligen kontroll och tillräckligt frekvent (t.ex. dagligen) registrering av temperatur, luftfuktighet, koldioxidhalt, belysning (ljusintensitet, våglängd, fotosyntetiskt aktiv strålning) och ljusperiod, bevattning, m.m. för att säkerställa god tillväxt, vilken bedöms genom kontroll av de utvalda arterna. Temperaturen i växthusen bör regleras genom ventilation, uppvärmning och/eller kylning. Följande förhållanden rekommenderas vanligen för tester i växthus:

— temperatur: 22 ± 10 °C,

— fuktighet: 70 ± 25 %,

— fotoperiod: minst 16 h ljus,

— ljusintensitet: 350 ± 50 $\mu E/m^2/s$. Det kan bli nödvändigt med extrabelysning om intensiteten minskar till under 200 $\mu E/m^2/s$, våglängd 400–700 nm, med undantag för vissa arter som är mindre ljuskrävande.

Miljöförhållandena bör övervakas och rapporteras under undersökningens gång. Växterna ska odlas i krukor av icke-porös plast eller glaserade krukor med en bricka eller ett fat under. Krukorna kan placeras om regelbundet för

▼M6

att minimera variabiliteten i växternas tillväxt (på grund av skillnader i testbetingelserna inom tillväxtanläggningen). Krukorna måste vara tillräckligt stora för att möjliggöra normal tillväxt.

23. Näringsämnen i jorden får kompletteras vid behov för att upprätthålla god växtkraft. Man kan bedöma om det finns behov av ytterligare näringsämnen och när dessa ska tillsättas genom observation av kontrollplantorna. Det rekommenderas att man vattnar testbehållarna underifrån (t.ex. med hjälp av glasfibervekar). Till att börja med kan man emellertid vattna ovanifrån för att stimulera frönas groning, och vid applicering på jordytan underlättar det även upptagningen av kemikalien i jorden.

24. De särskilda växtförhållandena bör anpassas för den art som testas och den testkemikalie som undersöks. Kontroller och testade plantor måste hållas under samma miljöförhållanden, men lämpliga åtgärder bör vidtas för att förhindra korsexponering (t.ex. av flyktiga kemikalier) mellan olika testkärl och av testkemikalien till kontrollerna.

Att testa en enda koncentration/dos

25. I syfte att fastställa lämplig koncentration/dos av en kemikalie för att utföra tester med en enda koncentration eller dos (belastningstest/gränstest), måste ett antal faktorer beaktas. För allmänna kemikalier inbegriper dessa faktorer kemikaliens fysikalisk-kemiska egenskaper. För växtskyddsprodukter måste man beakta testkemikaliens fysikalisk-kemiska egenskaper och användningsmönster, dess högsta koncentration eller appliceringsdos, antalet behandlingar per säsong och/eller testkemikaliens beständighet. För att avgöra om en allmän kemikalie har fytotoxiska egenskaper kan det vara lämpligt att testa vid en högsta halt på 1 000 mg/kg torr jord.

Preliminärt test

26. Vid behov kan ett preliminärt test utföras för att ge vägledning om de koncentrationer och doser som ska testas i den definitiva dos-responsstudien. I det preliminära testet ska testkoncentrationerna/-doserna vara jämnt fördelade (t.ex. 0,1, 1,0, 10, 100 och 1 000 mg/kg torr jord). För växtskyddsprodukter kan koncentrationerna/doserna grundas på den rekommenderade eller högsta tillåtna koncentrationen eller appliceringsdosen, t.ex. 1/100, 1/10, 1/1 av den rekommenderade/högsta tillåtna koncentrationen eller dosen.

Testning av flera olika koncentrationer/doser

27. Syftet med tester med flera koncentrationer/doser är att fastställa ett dos-responssamband och att fastställa ett EC_x- eller ER_x-värde för grodd, biomassa och/eller synliga effekter jämfört med kontroller som inte exponerats, beroende på vad som krävs av tillsynsmyndigheterna.

28. Antalet koncentrationer eller doser och intervallen mellan dem ska vara tillräckligt stora för att ett tillförlitligt dos-responssamband och en regressionsformel ska framträda och för att ge en uppskattning av EC_x eller ER_x. De valda koncentrationerna och doserna bör omfatta de EC_x- och ER_x-värden som ska fastställas. Om till exempel ett EC_{50}-värde krävs det skulle vara önskvärt för att testa doser som framkallar en effekt på mellan 20 och 80 %. Det rekommenderade antalet testkoncentrationer och testdoser som behövs för att uppnå detta är minst fem i en geometrisk serie plus en obehandlad kontroll, och ska skilja sig åt med en faktor på högst tre. För varje test- och kontrollgrupp bör antalet replikat vara minst fyra och det totala antalet frön bör vara minst 20. Ytterligare replikat av vissa växter med låg grobarhet eller

▼M6

varierande tillväxt kan behövas för att öka testets statistiska styrka. Om ett större antal koncentrationer och doser används kan antalet replikat minskas. Om NOEC ska uppskattas kan det behövas ytterligare replikat för att uppnå önskad statistisk styrka (23).

Observationer

29. Under observationsperioden, dvs. 14 till 21 dagar efter det att 50 % av kontrollplantorna har grott (även i kontroller med lösningsmedel i förekommande fall), studeras plantorna ofta (minst en gång i veckan och om möjligt dagligen) med avseende på groning och visuell fytotoxicitet och mortalitet. I slutet av provet registreras mätningarna av groningen i procent och de överlevande plantornas biomassa, samt synliga skadliga effekter på olika delar av plantorna. Det sistnämnda inbegriper yttre avvikelser hos de fröplantor som grott, hämmad tillväxt, kloros, missfärgning, mortalitet och effekter på växternas utveckling. Den slutliga biomassan kan mätas med hjälp av den slutliga genomsnittliga torrvikten för de överlevande växternas skott, genom att skörda skotten vid markytan och torka dem tills de uppnår konstant vikt vid 60 °C. Alternativt kan den slutliga biomassan fastställas med hjälp av skottens färskvikt. Skottens höjd kan utgöra en annan endpoint, om så krävs av tillsynsmyndigheterna. Ett enhetligt system för bedömning av visuella skador bör användas för att utvärdera observerbara toxiska reaktioner. Exempel på kvalitativa och kvantitativa visuella bedömningar återfinns i hänvisningarna (23) (24).

DATA OCH RAPPORTERING

Statistisk analys

Test av en enda koncentration/dos

30. Data för varje växtart bör analyseras med hjälp av en lämplig statistisk metod (21). Effektnivån vid testkoncentrationen/-dosen bör rapporteras, eller avsaknaden av en viss effekt vid testkoncentrationen/dosen (t.ex. <x % effekt iakttagen vid koncentrationen eller dosen *y*).

Test av flera koncentrationer/doser

31. Ett dos/respons-samband fastställs i form av en regressionsformel. Olika modeller kan användas. För uppskattning av EC_x eller ER_x (t.ex. EC_{25}, ER_{25}, EC_{50}, ER_{50}) och dess konfidensgränser för groning kan det till exempel vara lämpligt att använda dikotoma data eller logit-, probit-, Weibull- eller Spearman-Karbermetoderna, den modifierade Spearman-Karbermetoden osv. Om plantornas tillväxt (vikt och höjd) utgör kontinuerliga endpoints kan EC_x eller ER_x och motsvarande konfidensgränser uppskattas med hjälp av en lämplig regressionsanalys (t.ex. Bruce och Versteegs icke-linjära regressionsanalys (25)). Om möjligt ska R^2 vara 0,7 eller högre för de mest känsliga arterna, och de testkoncentrationer/doser som används ska omfatta effekter på 20–80 %. Om NOEC ska uppskattas bör företrädesvis kraftfulla statistiska tester användas, och dessa bör väljas på grundval av datafördelningen (21) (26).

Testrapport

32. Testrapporten ska presentera resultaten av undersökningarna samt en detaljerad beskrivning av testbetingelserna, en grundlig diskussion av resultaten, en dataanalys och de slutsatser som dragits från analysen. En schematisk sammanställning och sammanfattning av resultaten bör tillhandahållas. Rapporten ska innehålla följande:

▼M6

Testkemikalie:

— kemiska identifieringsdata, testkemikaliens relevanta egenskaper (t.ex. log P_{ow}, vattenlöslighet, ångtryck och uppgifter om omvandling, spridning och fördelning i miljön, om dessa finns tillgängliga),

— uppgifter om beredning av provlösningen och kontroll av testkoncentrationerna enligt vad som anges i punkt 18.

Testade arter:

— uppgifter om testorganismen: art/sort, växtfamilj, vetenskapligt namn och svenskt namn, fröets källa och historia (så detaljerat som möjligt, dvs. namnet på leverantören, grobarhet i procent, fröstorleksklass, klass, sändnings- och partinummer, frösättningsår eller den växtsäsong då fröet insamlades, datum då grobarheten fastställdes), grobarhet osv.,

— antal testade arter med enkla eller dubbla hjärtblad,

— motivering för val av arter,

— beskrivning av lagring, behandling och underhåll av fröna.

Testbetingelser:

— testanordningar (t.ex. odlingskammare, fytotron och växthus).

— beskrivning av testsystemet (t.ex. krukmått, krukmaterial och jordmängder),

— jordegenskaper (textur eller typ: fördelning och klassificering av jordpartiklar, fysikaliska och kemiska egenskaper inklusive procentandel organiska ämnen, procentandel organiskt kol och pH-värde),

— förberedelse av jorden/substratet (t.ex. jord, syntetisk jord, sand och annat) innan testet,

— beskrivning av näringsmediet om ett sådant använts,

— applicering av testkemikalien: beskrivning av appliceringsmetoden, beskrivning av utrustningen, exponeringsdos och volym inklusive kemisk verifiering, beskrivning av kalibreringsmetoden och beskrivning av miljöförhållandena under appliceringen,

— tillväxtförhållanden: ljusintensitet (t.ex. fotosyntetiskt aktiv strålning), fotoperiod, högsta/lägsta temperatur, bevattningsschema och -metod, gödsling,

— antal frön per kruka, antal plantor per dos, antal replikat (krukor) per exponeringsdos,

— antal och typ av kontroller (negativa och /eller positiva kontroller, lösningsmedelskontroll i förekommande fall),

— testets varaktighet.

Resultat:

— tabell för alla endpoints för varje replikat, testkoncentration/-dos och art,

— antal groddar och procentandel groning jämfört med kontrollerna,

— mätning av plantornas biomassa (skottens torrvikt eller färskvikt) uttryckt som en procentandel av kontrollerna,

▼M6

— skottens höjd uttryckt som en procentandel av kontrollerna, om detta har uppmätts,

— synbara skador i procent och kvalitativ och kvantitativ beskrivning av synbara skador (kloros, nekros, vissning, deformerade blad och stjälkar såväl som eventuell frånvaro av effekter) orsakade av testkemikalien i jämförelse med kontrollplantorna,

— beskrivning av den bedömningsskala som används för att bedöma synbara skador, om en visuell bedömning görs,

— för endosstudier bör procentandelen skador rapporteras,

— EC_x eller ER_x (t.ex. EC_{50}, ER_{50}, EC_{25}, ER_{25}) och därtill hörande konfidensgränser. Om regressionsanalys utförs ska standardfelet för regressionsformeln anges, och standardfelet för bedömningar av enskilda parametrar (t.ex. lutning, skärningspunkt),

— NOEC (och LOEC) om dessa värden beräknas,

— beskrivning av de statistiska metoder och antaganden som använts,

— grafisk framställning av dessa uppgifter och dos-responssambandet för den art som testats.

Avvikelser från de förfaranden som beskrivs i denna testmetod och ovanliga händelser under testets gång.

LITTERATUR

(1) Schrader, G., Metge, K., och Bahadir, M. (1998). Importance of salt ions in ecotoxicological tests with soil arthropods. Applied Soil Ecology, 7, 189–193.

(2) Internationella standardiseringsorganisationen. (1994). ISO 11269-1 Markundersökningar – Bestämning av föroreningars effekt på markfloran – Del 1: Metod för bestämning av tillväxthämning hos rötter.

(3) Internationella standardiseringsorganisationen. (1996). ISO 11269-2 Markundersökningar – Bestämning av föroreningars effekt på markfloran – Del 2: Kemikaliers inverkan på utveckling och tillväxt hos högre växter.

(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, Del 158.540. Underavdelning J, delarna 122-1 och 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) Boutin, C., Freemark, K. E. and Keddy, C. J. (1994). 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, Kanada.

▼M6

(9) Forster, R., Heimbach, U., Kula, C. och Zwerger, P. (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. Nr 48.

(10) Hale, B., Hall, J. C., Solomon, K. och Stephenson, G. (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, Kanada.

(11) Soil Texture Classification (US and FAO systems): Weed Science, 33, Suppl. 1 (1985) och Soil Sc. Soc. Amer. Proc. 26:305 (1962).

(12) Audus, L. J. (1964). Herbicide behaviour in the soil. I: Audus, L. J. (red.) *The Physiology and Biochemistry of Herbicides*, London, New York, Academic Press, NY, kapitel 5, s. 163–206.

(13) Beall, M. L., Jr. och Nash, R. G. (1969). Crop seedling uptake of DDT, dieldrin, endrin, and heptachlor from soil, J. Agro. 61, 571–575.

(14) Beetsman, G. D., Kenney, D. R. och Chesters, G. (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, 14 s., FDA, Washington, DC.

(16) McKelvey, R. A., Wright, J. P., Honegger, J. L. och Warren, L. W. (2002). A Comparison of Crop and Non-crop Plants as Sensitive Indicator Species for Regulatory Testing. Pest Management Science, vol. 58, 1161–1174.

(17) Boutin, C., Elmegaard, N. och Kjær, C. (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) Boutin, C. och Rogers, C. A. (2000). Patterns of sensitivity of plant species to various herbicides – An analysis with two databases. Ecotoxicology, vol. 9:4, 255–271.

(19) Boutin, C. och Harper, J. L. (1991). A comparative study of the population dynamics of five species of *Veronica* in natural habitats. J. Ecol. 9, 155–271.

(20) Boutin, C., Lee, H.-B., Peart, T. E., Batchelor, S. P. och Maguire, R. J. (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 nr 54, Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling, Paris.

(22) Hatzios, K. K. och Penner, D. (1985). Interactions of herbicides with other agrochemicals in higher plants. Rev. Weed Sci. 1, 1–63.

(23) Hamill, P. B., Marriage, P. B. och G. Friesen. (1977). A method for assessing herbicide performance in small plot experiments. Weed Science 25, 386–389.

(24) Frans, R. E. och Talbert, R. E. (1992). Design of field experiments and the measurement and analysis of plant response. I: B. Truelove (red.) Research Methods in Weed Science, andra upplagan, Southern Weed Science Society, Auburn, 15–23.

(25) Bruce, R. D. och Versteeg, D. J. (1992). A Statistical Procedure for Modelling Continuous Toxicity Data. Environmental Toxicology and Chemistry 11, 1485–1492.

(26) Kapitel C.33 i denna bilaga: Reproduktionstest för daggmaskar (*Eisenia fetida* och *Eisenia andrei*).

▼M6

Tillägg 1

Definitioner

Aktiv substans (eller verksamt ämne): ett ämne som har skapats för att ge en viss biologisk verkan (t.ex., insektsbekämpning, bekämpning av växtsjukdomar, ogräsbekämpning på exponeringsområdet), även kallat verksam beståndsdel av teknisk kvalitet, verksamt ämne.

Kemikalie: ett ämne eller en blandning.

Växtskyddsprodukter eller växtskyddsmedel eller bekämpningsmedel: ämnen med en särskild biologisk aktivitet som avsiktligt används för att skydda grödor mot skadedjur (t.ex. svampsjukdomar, insekter och konkurrerande plantor).

EC_x (x % Effect Concentration) eller ER_x (x % Effect Rate): den koncentration eller den dos som leder till en oönskad ändring med x % av den endpoint i testet som mäts i förhållande till kontrollen (t.ex. en 25 % eller 50 % minskning av grobarheten, skottens vikt, det slutliga antalet plantor, eller ökning av de synbara skadorna skulle utgöra EC_{25}/ER_{25} respektive EC_{50}/ER_{50}).

Groning: koleoptilens eller hjärtblandens framträdande ovanför markytan.

Beredning: den kommersiella sammansatta produkt som innehåller det verksamma ämnet (den aktiva substansen), även kallat slutlig beredning [1] eller typisk slutanvändningsprodukt (TEP, typical end-use product).

Lägsta koncentration med observerad effekt (LOEC): den lägsta koncentration av testkemikalien vid vilken effekt har noterats. I detta test har en koncentration som motsvarar LOEC en statistiskt signifikant effekt ($p < 0,05$) efter en given exponeringstid jämfört med kontrollen, och är högre än NOEC-värdet.

Växter som inte är målarter: växter som befinner sig utanför målområdet. För växtskyddsprodukter gäller detta vanligtvis växter som befinner sig utanför det behandlade området.

Nolleffektkoncentrationen (NOEC): den högsta koncentrationen av testkemikalien vid vilken ingen effekt har noterats. I detta test har en halt som motsvarar NOEC ingen statistiskt signifikant effekt ($p < 0,05$) efter en given exponeringstid jämfört med ett kontrollprov.

Fytotoxicitet: negativa avvikelser (av uppmätta och visuella utvärderingar) från plantornas normala typexempel när det gäller utseende och tillväxt som reaktion på en bestämd kemikalie.

Replikat: den experimentella enhet som motsvarar kontrollgruppen och/eller testgruppen. I dessa undersökningar definieras en kruka som replikat.

Visuell bedömning: värdering av synliga skador som grundar sig på observationer av upprätt växt, växtkraft, missbildningar, kloros, nekros och helhetsutseende jämfört med en kontroll.

Testkemikalie: alla ämnen eller blandningar som testas med denna testmetod.

[1] Slutlig beredning: den sammansatta produkt som innehåller den verksamma kemikalien (det verksamma ämnet) och som säljs i handeln.

▼M6

Tillägg 2

Förteckning över arter som historiskt sett har använts för växttester

Familj	Art	Svenskt namn
DICOTYLEDONAE		
Apiaceae (Umbelliferae)	*Daucus carota*	Morot
Asteraceae (Compositae)	*Helianthus annuus*	Solros
Asteraceae (Compositae)	*Lactuca sativa*	Sallat
Brassicaceae (Cruciferae)	*Sinapis alba*	Vitsenap
Brassicaceae (Cruciferae)	*Brassica campestris* var. *chinensis*	Salladskål
Brassicaceae (Cruciferae)	*Brassica napus*	Raps
Brassicaceae (Cruciferae)	*Brassica oleracea* var. *capitata*	Vitkål
Brassicaceae (Cruciferae)	*Brassica rapa*	Rova
Brassicaceae (Cruciferae)	*Lepidium sativum*	Kryddkrasse
Brassicaceae (Cruciferae)	*Raphanus sativus*	Rädisa
Chenopodiaceae	*Beta vulgaris*	Sockerbeta
Cucurbitaceae	*Cucumis sativus*	Gurka
Fabaceae (Leguminosae)	*Glycine max (G. soja)*	Sojaböna
Fabaceae (Leguminosae)	*Phaseolus aureus*	Mungböna
Fabaceae (Leguminosae)	*Phaseolus vulgaris*	Böna
Fabaceae (Leguminosae)	*Pisum sativum*	Ärtor
Fabaceae (Leguminosae)	*Trigonella foenum-graecum*	Bockhornsklöver
Fabaceae (Leguminosae)	*Lotus corniculatus*	Käringtand
Fabaceae (Leguminosae)	*Trifolium pratense*	Rödklöver
Fabaceae (Leguminosae)	*Vicia sativa*	Vicker
Linaceae	*Linum usitatissimum*	Lin
Polygonaceae	*Fagopyrum esculentum*	Bovete
Solanaceae	*Solanum Lycopersicon*	Tomat

▼**M6**

Familj	Art	Svenskt namn
MONOCOTYLEDONAE		
Liliaceae (Amaryllada-ceae)	*Allium cepa*	Lök
Poaceae (Gramineae)	*Avena sativa*	Havre
Poaceae (Gramineae)	*Hordeum vulgare*	Korn
Poaceae (Gramineae)	*Lolium perenne*	Engelskt rajgräs
Poaceae (Gramineae)	*Oryza sativa*	Ris
Poaceae (Gramineae)	*Secale cereale*	Råg
Poaceae (Gramineae)	*Sorghum bicolor*	Durra
Poaceae (Gramineae)	*Triticum aestivum*	Vete
Poaceae (Gramineae)	*Zea mays*	Majs

▼M6

Tillägg 3

Förteckning över potentiellt användbara arter som inte är grödor

OECD:s potentiellt användbara arter för testning av toxicitet

Anmärkning: Följande tabell innehåller uppgifter om 52 arter som inte är grödor (hänvisningar ges inom parentes för varje post). Grobarhetssiffrorna kommer från publicerade källor och är bara tänkta som allmän vägledning. Den enskilda erfarenheten kan variera beroende på den källa fröna kommer ifrån och andra faktorer.

FAMILJ Arter Vetenskapligt namn (svenskt namn)	Livslängd [1] & livsmiljö	Frövikt (mg)	Fotoperiod för groning eller tillväxt [2]	Planteringsdjup (mm) [3]	Groningstid (dagar) [4]	Särskild behandling [5]	Toxicitetstest [6]	Fröleve-rantörer [7]	Andra hänvisningar [8]
APIACEAE *Torilis japónica* (rödkörvel)	A, B störda områden, häckar, betesmarker (16, 19)	1,7–1,9 (14, 19)	L = M (14)	0 (1, 19)	5 (50 %) (19)	kall stratifiering (7, 14, 18, 19) mognande evt. nödvändigt (19) grobarheten hämmas av mörker (1, 19) inga särskilda behandlingar (5)	EFTER (5)		
ASTERACEAE *Bellis perennis* (tusensköna)	P gräsmark, åkermark, gräsmattor (16, 19)	0,09–0,17 (4, 19)	L = M (14)	0 (4)	3 (50 %) (19) 11 (100 %) (18)	grobarheten påverkas ej av strålning (18, 19) inga särskilda behandlingar (4, 14)	EFTER (4)	A, D, F	7
Centaurea cyanus (blåklint)	A fält, vägkanter, öppen miljö (16)	4,1–4,9 (4, 14)	L = M (14)	0–3 (2, 4, 14)	14–21 (100 %) (14)	Inga särskilda behandlingar (2, 4)	EFTER (2,4)	A, D, E, F	7
Centaurea nigra (svartklint)	P fält, vägkanter, öppen miljö (16, 19)	2,4–2,6 (14, 19)	L = M (14)	0 (19)	3 (50 %) (19) 4 (97 %) (18)	mognande evt. nödvändigt (18, 19) grobarheten hämmas av mörker (19) inga särskilda behandlingar (5, 14, 26)	EFTER (5, 22, 26)	A	
Inula helenium (ålandsrot)	P fuktiga, störda områden (16)	1–1,3 (4, 14, 29)		0 (4, 29)		inga särskilda behandlingar (4)	EFTER (4)	A, F	

▼M6

FAMILJ Arter Vetenskapligt namn (svenskt namn)	Livslängd [1] & livsmiljö	Frövikt (mg)	Fotoperiod för groning eller tillväxt [2]	Planteringsdjup (mm) [3]	Groningstid (dagar) [4]	Särskild behandling [5]	Toxicitetstest [6]	Fröleve-rantörer [7]	Andra hänvisningar [8]
Leontodon hispidus (sommarfibbla)	P fält, vägkanter, störda områden (16, 19)	0,85–1,2 (14, 19)	L = M (14)	0 (19)	4 (50 %) (19) 7 (80 %) (18)	grobarheten hämmas av mörker (17, 18, 19) inga särskilda behandlingar (5, 23)	EFTER (5, 22, 23)		
Rudbeckia hirta (sträv rudbeckia)	B, P störda områden (16)	0,3 (4, 14)	L = M (14)	0 (4, 33)	< 10 (100 %) (33)	inga särskilda behandlingar (4, 14, 33)	EFTER (4, 33)	C, D, E, F	
Solidago canadensis (kanadensiskt gullris)	P betesmark, öppna områden (16)	0,06–0,08 (4, 14)	L = M (11)	0 (4)	14–21 (11)	blanda med lika delar sand och blötlägg i 500ppm gibberellinsyra i 24 timmar (11) inga särskilda behandlingar (4)	EFTER (4)	E, F	
Xanthium pensylvanicum (gullfrö)	A fält, öppen miljö (16)	25–61 (14, 29)		0 (1) 5 (29)		grobarheten kan begränsas av mörker (1) blötlägg i varmt vatten i 12 timmar (29)	FÖRE & EFTER (31)	A	
Xanthium spinosum (tistelgullfrö)	A öppen miljö (16)	200 (14)	L = M (14) L > M (6)	10 (6)		scarifiering (14) inga särskilda behandlingar (6)	FÖRE & EFTER (6)	A	
Xanthium strumarium (mörkt gullfrö)	A fält, öppen miljö (16)	67,4 (14)	L = M (14)	10–20 (6, 21)		inga särskilda behandlingar (6, 14, 21)	FÖRE & EFTER (6, 21, 28, 31)	A	
BRASSICACEAE *Cardamine pratensis* (ängsbräsma)	P fält, vägkanter, gräsmattor(16, 19)	0,6 (14, 19)	L = M (14)	0 (19)	5 (50 %) (19) 15 (98 %) (18)	grobarheten hämmas av mörker (18, 19) inga särskilda behandlingar (5, 14, 22)	EFTER (5, 22)	F	

▼M6

FAMILJ Arter Vetenskapligt namn (svenskt namn)	Livslängd [1] & livsmiljö	Frövikt (mg)	Fotoperiod för groning eller tillväxt [2]	Planteringsdjup (mm) [3]	Groningstid (dagar) [4]	Särskild behandling [5]	Toxicitetstest [6]	Fröleve-rantörer [7]	Andra hänvisningar [8]
CARYOPHYLLACEAE *Lychnis flos-cuculi* (gökblomster)	P (16)	0,21 (14)	L = M (14)		< 14 (100 %) (14, 25)	mognande evt. nödvändigt (18) inga särskilda behandlingar (5, 14, 15, 22 och 26)	EFTER (5, 15, 22–26)	F	
CHENOPODIACEAE *Chenopodium album* (svinmålla)	A åkerkanter, störda områden (16, 19)	0,7–1,5 (14, 19, 34)	L = M (14)	0 (1, 19)	2 (50 %) (19)	behandlingen varierar beroende på frönas färg (19) torrlagring under vintervila (19) grobarheten hämmas av mörker (1, 18, 19) kall stratifiering (18) inga särskilda behandlingar (14, 34)	FÖRE & EFTER (28, 31, 34)	A	32
CLUSIACEAE *Hypericum perforatum* (johannesört)	P fält, åkermark, öppen miljö (16, 19)	0,1–0,23 (14, 19)	L = M (14)	0 (1, 19)	3 (19) 11 (90 %) (18)	grobarheten hämmas av mörker (1, 18, 19) inga särskilda behandlingar (5, 14, 15, 25, 27)	EFTER (5, 15, 25, 27)	A, E, F	
CONVOLVULACEAE *Ipomoea hederacea* (murgrönsvinda)	A vägkanter, öppen miljö, veteåkrar (16)	28,2 (14)	L > M (6, 10)	10–20 (6, 10, 21)	4 (100 %) (10)	grobarheten påverkas inte av strålning (1) inga särskilda behandlingar (6, 21)	FÖRE & EFTER (6, 12, 21, 28)	A	
CYPERACEAE *Cyperus rotundus* (runt cypergräs)	P åkermark, betesmark, vägkanter (16, 30)	0,2 (14)	L = M (14)	0 (1) 10–20 (6, 10).	12 (91 %) (10)	grobarheten hämmas av mörker (1) inga särskilda behandlingar (6, 10, 14)	FÖRE & EFTER (6, 28, 31)	B	7
FABACEAE *Lotus corniculatus* (käringtand)	P gräsbevuxna områden, vägkanter, öppen miljö (16, 19)	1–1,67 (14, 19)	L = M (14)		1 (50 %) (19)	scarifiering (14, 19) grobarheten påverkas inte av strålning (18, 19) inga särskilda behandlingar (23, 25)	EFTER (5, 23, 25)	A, D, E, F	

▼M6

FAMILJ Arter Vetenskapligt namn (svenskt namn)	Livslängd [1] & livsmiljö	Frövikt (mg)	Fotoperiod för groning eller tillväxt [2]	Planteringsdjup (mm) [3]	Groningstid (dagar) [4]	Särskild behandling [5]	Toxicitetstest [6]	Fröleve-rantörer [7]	Andra hänvisningar [8]
Senna obtusifolia (sojasenna)	A fuktiga skogar (16)	23–28 (9)	L = M (14) L > M (9)	10–20 (6,9)		blötlägg fröna i vatten i 24 timmar (9) scarifiering (14) frönas livskraft beror på färgen (1) inga särskilda behandlingar (6)	EFTER (6,9)	A	
Sesbania exaltata (svenskt namn saknas)	A alluvial jord (16)	11–13 (9, 14)	L > M (9)	10–20 (9, 21)		blötlägg fröna i vatten i 24 timmar (9) grobarheten påverkas inte av strålning (1) inga särskilda behandlingar (21)	FÖRE & EFTER (9, 21, 28, 31)	A	
Trifolium pratense (rödklöver)	P fält, vägkanter, åkermark (16, 19)	1,4–1,7 (14, 19)	L = M (14)		1 (50 %) (19)	scarifiering (14, 18) mognande evt. nödvändigt (19) grobarheten påverkas inte av strålning (1, 19) inga särskilda behandlingar (5)	EFTER (5)	A, E, F	
LAMIACEAE *Leonurus cardiaca* (hjärtstilla)	P öppna områden (16)	0,75–1,0 (4, 14)	L = M (14)	0 (4)		inga särskilda behandlingar (4, 14)	EFTER (4)	F	
Mentha spicata (grönmynta)	P fuktiga områden (16)	2,21 (4)		0 (4)		inga särskilda behandlingar (4)	EFTER (4)	F	
Nepeta cataria (kattmynta)	P störda områden (16)	0,54 (4, 14)	L = M (14)	0 (4)		inga särskilda behandlingar (2, 4, 14)	EFTER (2, 4)	F	

▼M6

FAMILJ Arter Vetenskapligt namn (svenskt namn)	Livslängd [1] & livsmiljö	Frövikt (mg)	Fotoperiod för groning eller tillväxt [2]	Planteringsdjup (mm) [3]	Groningstid (dagar) [4]	Särskild behandling [5]	Toxicitetstest [6]	Fröleve-rantörer [7]	Andra hänvisningar [8]
Prunella vulgaris (brunört)	P åkermark, gräsbevuxna områden, störda områden (16, 19)	0,58–1,2 4, 14, 19	L = M (14)	0 4, 19	5 (50 %) (19) 7 (91 %) (18)	grobarheten hämmas av mörker (18, 19) större grobarhet med större frön (1) inga särskilda behandlingar (4, 14, 22)	EFTER (4, 22)	A, F	
Stachys officinalis (humlesuga)	P gräsmark, åkerkanter (19)	14–18 (14, 19)	L = M (14)		7 (50 %) (19)	inga särskilda behandlingar (5, 14, 22)	EFTER (5, 22)	F	
MALVACEAE *Abutilón theophrasti* (lindmalva)	A fält, öppen miljö (16)	8,8 (14)	L = M (14)	10–20 (6, 10, 21)	4 (84 %) (10)	scarifiering (14) inga särskilda behandlingar (5, 10, 21)	FÖRE & EFTER (6, 22, 28, 31)	A, F	
Sida spinosa (taggmalva)	A fält, vägkanter (16)	3,8 (14)	L = M (14)	10–20 6, 21		scarifiering (14) grobarheten påverkas inte av strålning (1) inga särskilda behandlingar (6, 21)	FÖRE & EFTER 6, 21, 28, 31	A, F	
PAPAVERACEAE *Papaver rhoeas* (kornvallmo)	A fält, åkermark, störda områden (16, 19)	0,1–0,3 4, 14, 19, 29	L = M (14)	0 (4, 29)	4 (50 %) (19)	kall stratifiering & scarifiering (1, 19, 32) inga särskilda behandlingar (4, 14, 29)	EFTER (4)	A, D, E, F, G	
POACEAE *Agrostis tenuis* (rödven)	gräsmattor, betesmark (16)	0,07 (14)	L > M (IO)	20 (10)	10 (62 %) (10)	grobarheten hämmas av mörker (1, 17–19) inga särskilda behandlingar (10)	EFTER (10)	A, E	
Alopecurus myosuroides (renkavle)	A fält, öppen miljö (16)	0,9–1,6 (29, 34)	L = M (14)	2 (29)	< 24 (30 %) (34)	scarifiering (14) behandla med 101 mg/l KNO3 (14) varm stratifiering (1) grobarheten hämmas av mörker (1) inga särskilda behandlingar (34)	FÖRE & EFTER (28, 34)	A	32

▼M6

FAMILJ Arter Vetenskapligt namn (svenskt namn)	Livslängd [1] & livsmiljö	Frövikt (mg)	Fotoperiod för groning eller tillväxt [2]	Planteringsdjup (mm) [3]	Groningstid (dagar) [4]	Särskild behandling [5]	Toxicitetstest [6]	Fröleve-rantörer [7]	Andra hänvisningar [8]
Avena fatua (flyghavre)	A odlade områden, öppen miljö (16)	7–37,5 (14, 30)	L = M (14) L > M (6)	10–20 (6, 10).	3 (70 %) (18)	scarifiering (7, 32) mörker hämmar grobarheten (1) kall stratifiering (1, 18) inga särskilda behandlingar (6, 10, 14)	FÖRE & EFTER (6, 10, 28, 31)	A	
Bromus tectorum (taklosta)	A fält, vägkanter, åkermark (16)	0,45–2,28 (14, 29)	L = M (14)	3 (29)		mognadsperiod (1, 7, 32) grobarheten hämmas av ljus (1) inga särskilda behandlingar (14)	FÖRE & EFTER (28, 31)	A	
Cynosurus cristatus (kamäxing)	P fält, vägkanter, öppen miljö (16, 19)	0,5–0,7 (14, 19, 29)	L = M (14)	0 (29)	3 (50 %) (19)	grobarheten påverkas inte av strålning (19) inga särskilda behandlingar (14, 29)	EFTER (5)	A	
Digitaria sanguinalis (blodhirs)	A fält, gräsmattor, öppen miljö (16)	0,52–0,6 (14, 30)	L = M (14)	10-20 (21)	7 (75 %) 14 (94 %) (7)	scarifiering, kall stratifiering, & mognande (1, 7, 14, 32) behandlas med 101 mg/l KNO3 (14) grobarheten hämmas av mörker (1) inga särskilda behandlingar (21)	FÖRE & EFTER (18, 25, 31)	A	
Echinochloa crus-galli (hönshirs)	A (16)	1,5 (14)	L = M (14) L > M (3)	10–20 (7, 21)		scarifiering (7, 32) grobarheten påverkas inte av strålning (1) inga särskilda behandlingar (3, 14, 21)	FÖRE & EFTER (3, 21, 28, 31)	A	
Elymus canadensis (kanadaelm)	P strandnära, störda områden (16)	4–5 (14, 30)	L = M (11)	1 (11)	14–28 (11)	inga särskilda behandlingar (2, 11)	EFTER (2)	C, D, E	
Festuca pratensis (ängssvingel)	P fält, fuktiga områden (16, 19)	1,53–2,2 (16, 19)	L = M (14) L > M (10)	20 (10)	9 (74 %) (10) 2 (50 %) (19)	inga särskilda behandlingar (10, 19)	EFTER (10)	A	7

▼M6

FAMILJ Arter Vetenskapligt namn (svenskt namn)	Livslängd [1] & livsmiljö	Frövikt (mg)	Fotoperiod för groning eller tillväxt [2]	Planteringsdjup (mm) [3]	Groningstid (dagar) [4]	Särskild behandling [5]	Toxicitetstest [6]	Fröleve-rantörer [7]	Andra hänvisningar [8]
Hordeum pusillum (dvärgkorn)	A betesmark, vägkanter, öppen miljö (16)	3,28 (14)				Varm stratifiering (1) grobarheten påverkas inte av strålning (1)	FÖRE (31)		7
Phieum pratense (timotej)	P betesmark, åkermark, störda områden (16, 19)	0,45 (14, 19)	L > M (10, 14)	0–10 (10, 19)	2 (74 %) (10) 8 (50 %) (19)	grobarheten hämmas av mörker (19) grobarheten påverkas inte av strålning (17) inga särskilda behandlingar (10, 14, 17, 19)	EFTER (10)	A, E	
POLYGONACEAE *Polygonum convolvulus* (åkerbinda)	A öppen miljö, vägkanter (16)	5–8 (4, 14, 29)	L = M (20)	0–2 (4, 29)		Kall stratifiering i 4–8 veckor (1, 2, 4, 20, 29) grobarheten påverkas inte av strålning (1)	FÖRE & EFTER 1, 2, 20, 28, 31	A	32
Polygonum lapathifolium (pilört)	A fuktig jord (16)	1,8–2,5 (14)	L > M (6)		5 (94 %) (18)	Grobarheten påverkas inte av strålning (1) grobarheten hämmas av mörker (18) kall stratifiering (1) inga särskilda behandlingar (5)	FÖRE & EFTER (6)	A, E	
Polygonum pennsylvanicum (svenskt namn saknas)	A fält, öppen miljö (16)	3,6–7 (14, 29)		2 (29)		kall stratifiering i 4 v. vid 0–5 °C (1, 29) grobarheten hämmas av mörker (1)	FÖRE (31)	A, E	
Polygonum persicaria (åkerpilört)	A störda områden, åkermark (16, 19)	2,1–2,3 (14, 19)	L > M (13)	0 (19)	< 14 (13) 2 (50 %) (19)	scarifiering, kall stratifiering, behandling med gibberellinsyra (14) kall stratifiering, mognande (17–19) grobarheten hämmas av mörker (19) inga särskilda behandlingar (13)	EFTER (13)	A	32

▼M6

FAMILJ Arter Vetenskapligt namn (svenskt namn)	Livslängd [1] & livsmiljö	Frövikt (mg)	Fotoperiod för groning eller tillväxt [2]	Planteringsdjup (mm) [3]	Groningstid (dagar) [4]	Särskild behandling [5]	Toxicitetstest [6]	Fröleve-rantörer [7]	Andra hänvisningar [8]
Rumex crispus (krusskräppa)	P åkermark, vägkanter, öppna områden (16, 19)	1,3–1,5 (4, 14, 19)	L = M (14, 33)	0 (4, 19, 33)	3 (50 %) (19) 6 (100 %) (33)	grobarheten hämmas av mörker (18, 19) mognande evt. nödvändigt (18) inga särskilda behandlingar (4, 14, 33)	EFTER (4, 33)	A, E	32
PRIMULACEAE *Anagallis arvensis* (rödmire)	A åkermark, öppna områden, störda områden (16, 19)	0,4–0,5 (4, 14, 19)	L = M (14)		1 (50 %) (19)	kall stratifiering, behandling med gibberellinsyra (1,14, 18, 19, 32) ljus krävs för groning (1) inga särskilda behandlingar (2, 4)	EFTER (2,4)	A, F	
RANUNCULACEAE *Ranunculus acris* (smörblomma)	P åkermark, vägkanter, öppna områden (16, 19)	1,5–2 (14, 19, 29)	L = M (14)	1 (29)	41–56 (19, 29)	inga särskilda behandlingar (5, 14, 22, 24–26)	EFTER (5, 22, 24–26)		32
ROSACEAE *Geum urbanum* (nejlikrot)	P häckar, fuktiga områden (16, 19)	0,8–1,5 (14, 19)	L = M (14)	0 (19)	5 (50 %) (19) 16 (79 %) (18)	grobarheten hämmas av mörker (18, 19) varm stratifiering (1) inga särskilda behandlingar (5, 14, 22, 25, 26)	EFTER (5, 22, 25, 26)	A	
RUBIACEAE *Galium aparine* (snärjmåra)	A åkermark, fuktiga områden, störda områden (16, 19)	7–9 (14, 19)	L = M (14)		5 (50 %) (19) 6 (100 %) (18)	kall stratifiering (1, 18, 19) grobarheten påverkas inte av strålning (18, 19) ljus hämmar grobarheten (1) inga särskilda behandlingar (6, 14)	FÖRE & EFTER (6, 28)	A	32

▼M6

FAMILJ Arter Vetenskapligt namn (svenskt namn)	Livslängd (1) & livsmiljö	Frövikt (mg)	Fotoperiod för groning eller tillväxt (2)	Planteringsdjup (mm) (3)	Groningstid (dagar) (4)	Särskild behandling (5)	Toxicitetstest (6)	Fröleve-rantörer (7)	Andra hänvisningar (8)
Galium mollugo (stormåra)	P häckvallar, öppna områden (8)	7 (29)	L = M (14)	2 (29)		inga särskilda behandlingar (5, 14, 22, 24, 26, 29)	EFTER (5, 22, 24, 26)	A	
SCROPHULARIACEAE *Digitalis purpurea* (fingerborgsblomma)	B, P häckar, öppna områden (16, 19)	0,1–0,6 (4, 14, 19)	L = M (14)	0 4, 19	6 (50 %) (19) 8 (99 %) (18)	grobarheten hämmas av mörker (1, 17 och 19) inga särskilda behandlingar (4, 22 och 26)	EFTER (4, 22–26)	D, F, G	
Veronica persica (trädgårdsveronika)	A åkermark, öppna områden, störda områden (16, 19)	0,5–0,6 (14, 19)	L = M (14)	0 (19)	3 (19) 5 (96 %) (18)	grobarheten hämmas av mörker (18, 19) kall stratifiering (18) inga särskilda behandlingar (14)	FÖRE & EFTER (28)	A	32

(1) A = Annueller, B = Bienner, P = Perenner.
(2) Hänvisningarna 11,14 och 33 gäller andelen ljus (L) och mörker (M) som krävs för att framkalla groning. Referenserna 3, 6, 9, 10, 13, 20 gäller odlingsförhållandena i växthus.
(3) 0 mm betyder att fröna såddes på markytan eller att fröna behöver ljus för att gro.
(4) Siffrorna står för det antal dagar under vilka en viss procentandel av fröna grodde enligt den källa det hänvisas till, t.ex. 3 dagar (50 %) groning (hänvisning 19).
(5) Uppgifter om mognandets och/eller stratifieringens varaktighet finns inte alltid att tillgå. Med undantag för krav som rör kylbehandling anges inte temperaturförhållandena eftersom man har begränsad kontroll över temperaturen vid tester i växthus. De flesta frön kommer att gro under de normala temperaturvariationerna i växthus.
(6) Betecknar att arten användes i ett toxicitetstest med herbicider antingen före (FÖRE) och/eller efter (EFTER) groning.
(7) Här ges exempel på kommersiella fröleverantörer.
(8) Här anges två alternativa källor som har använts.

▼M6

Fröleverantörer som anges i tabellen

Leverantörs-ID	Leverantörsuppgifter
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 KANADA (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 www.chilternseeds.co.uk
G	Thompson & Morgan P.O. Box 1051, Fort Erie, ON L2A 6C7 KANADA (800) 274 – 7333 www.thompson-morgan.com

HÄNVISNINGAR

(1) Baskin, C. C. och Baskin, J. M. (1998). Seeds. Academic Press, Toronto

(2) Blackburn, L. G. och Boutin, C. (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) Boutin, C., Lee, H-B., Peart, T., Batchelor, P. S och Maguire, R. J. (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) Boutin, C., Elmegaard, N. och Kjaer, C. (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) Breeze, V., Thomas, G. och Butler, R. (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) Brown, R. A. och Farmer, D. (1991). Track-sprayer and glasshouse techniques for terrestrial plant bioassays with pesticides. I: Plants for toxicity assessment, vol. 2. ASTM STP 1115, J. W. Gorsuch, W. R. Lower, W. Wang och M. A. Lewis (red.). American Society for Testing & Materials, Philadelphia. s. 197–208.

▼M6

(7) Buhler, D. D. och Hoffman, M. L. (1999). Anderson's guide to practical methods of propagating weeds and other plants. Weed Science Society of America, Lawrence, K.

(8) Clapham, P. A., Tutin, T. G. och Warburg, E .F. (1981). Excursion flora of the British Isles, tredje upplagan. Cambridge University Press, Cambridge

(9) Clay, P. A. och Griffin, J. L. (2000). Weed seed production and seedling emergence response to late-season glyphosate applications. Weed Science, 48, 481–486.

(10) Cole, J. F. H. och Canning, L. (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) Fiely, M. (Ernst Conservation Seeds). (2004). Pers. med. (www.ernst-seed.com)

(12) Fletcher, J. S., Johnson, F. L. och McFarlane, J. C. (1990). Influence of greenhouse versus field testing and taxonomic differences on plant sensitivity to chemical treatment. Environmental Toxicology & Chemistry, 9, 769–776.

(13) Fletcher, J. S., Pfleeger, T. G., Ratsch, H. C. och Hayes, R. (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) Flynn, S., Turner, R. M., och Dickie, J. B. (2004). Seed Information Database (utgåva 6.0, oktober 2004) Royal Botanic Gardens, Kew (www.rbgkew.org.uk/data/sid)

(15) Franzaring, J., Kempenaar, C. och van der Eerden, L. J. M. (2001). Effects of vapours of chlorpropham and ethofumesate on wild plant species. Environmental Pollution, 114, 21–28.

(16) Gleason, H.A. och Cronquist, A. (1991). Manual of vascular plants of northeastern United States and adjacent Canada, andra upplagan. New York Botanical Garden, Bronx, NY

(17) Grime, J. P. (1981). The role of seed dormancy in vegetation dynamics. Annals of Applied Biology, 98, 555–558.

(18) Grime, J. P., Mason, G., Curtis, A. V., Rodman, J., Band, S. R., Mowforth, M. A. G., Neal, A. M. och Shaw, S. (1981). A comparative study of germination characteristics in a local flora. Journal of Ecology, 69, 1017–1059.

(19) Grime, J. P., Hodgson, J. G. och Hunt, R. (1988). Comparative plant ecology: a functional approach to common British species. Unwin Hyman Ltd., London

(20) Kjaer, C. (1994). Sublethal effects of chlorsulfuron on black bindweed (Polygonum convolvulus L.). Weed Research, 34, 453–459.

(21) Klingaman, T. E., King, C. A. och Oliver, L. R. (1992). Effect of application rate, weed species, and weed stage of growth on imazethapyr activity. Weed Science, 40, 227–232.

(22) Marrs, R. H., Williams, C. T., Frost, A. J. och Plant, R. A. (1989). Assessment of the effects of herbicide spray drift on a range of plant species of conservation interest. Environmental Pollution, 59, 71–86.

(23) Marrs, R. H., Frost, A. J. och Plant, R.A. (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) Marrs, R. H., Frost, A. J. och Plant, R.A. (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) Marrs, R. H., Frost, A. J., Plant, R. A. och Lunnis, P. (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) Marrs, R. H. och Frost, A. J. (1997). A microcosm approach to detection of the effects of herbicide spray drift in plant communities. Journal of Environmental Management, 50, 369–388.

(27) Marshall, E. J. P. och Bernie, J. E. (1985). Herbicide effects on field margin flora. BCPC – Weeds. s. 1021–1028.

(28) McKelvey, R. A., Wright, J. P. och Honegger, J. L. (2002). A comparison of crop and non-crop plants as sensitive species for regulatory testing. Pest Management Science, 58, 1161–1174.

(29) Morton, S. (Herbiseed). (2004). Pers. med. (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) Webster, R. H. (1979). Technical Report No. 56: Growing weeds from seeds and other propagules for experimental purposes. Agricultural Research Council Weed Research Organization, Oxford.

(33) White, A. L. och Boutin, C. (National Wildlife Research Centre, Environment Canada). (2004). Pers. med.

(34) Zwerger, P. och Pestemer, W. (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

Tillägg 4

Exempel på lämpliga odlingsbetingelser för vissa arter av grödor

Följande betingelser har befunnits lämpliga för tio arter av grödor, och de kan användas som vägledning för tester i odlingskammare med vissa andra arter:

Koncentration av koldioxid: 350 ± 50 ppm.

Relativ luftfuktighet 70 ± 5 % under ljusperioder och 90 ± 5 % under mörkerperioder.

Temperatur: 25 ± 3 °C under dagen, 20 ± 3 °C under natten.

Fotoperiod: 16 h ljus/8 h mörker. Ljuset ska ha en genomsnittlig våglängd på 400–700 nm.

Ljus: luminans 350 ± 50 μE/m^2/s, uppmätt högst upp i krontaket.

Grödorna är följande:

— tomat (*Solanum lycopersicon*),

— gurka (*Cucumis sativus*),

— trädgårdssallat (*Lactuca sativa*),

— sojaböna (*Glycine max*),

— kål (*Brassica oleracea* var. *capitata*),

— morot (*Daucus carota*),

— havre (*Avena sativa*),

— engelskt rajgräs (*Lolium perenne*),

— sockermajs (*Zea mays*),

— lök (*Allium cepa*).

▼M6

C.32 REPRODUKTIONSTEST FÖR SMÅRINGMASKAR (ENCHYTRAEIDAE)

INLEDNING

1. Denna testmetod motsvarar OECD:s testriktlinje (TG) 220 (2004). Den är utformad för att användas för bestämning av effekterna av kemikalier på reproduktionskapaciteten hos småringmasken *Enchytraeus albidus* (vit ringmask) Henle 1873, i jord. Den bygger främst på en metod som har utvecklats av den federala tyska miljöskyddsmyndigheten (1) och som har ringtestats (2). Andra metoder för testning av kemikaliers toxicitet för småringmaskar och daggmaskar har också övervägts (3) (4) (5) (6) (7) (8).

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN

2. Marklevande ringmaskar av släktet *Enchytraeus* är ekologiskt relevanta för ekotoxikologisk testning. Småringmaskar påträffas ofta i jordar som innehåller daggmaskar, men samtidigt är de ofta vanliga i många jordar där daggmaskar saknas. Småringmaskar kan användas i laboratorietester samt i studier under fältliknande förhållanden och i fältstudier. Ur praktisk synvinkel är många småringmaskar lätta att hantera och föda upp, och deras reproduktionscykel är betydligt kortare än daggmaskarnas. Ett reproduktionstest med småringmaskar tar därför bara 4–6 veckor, medan det för daggmaskar (*Eisenia fetida*) tar 8 veckor.

3. Grundläggande information om småringmaskarnas ekologi och ekotoxikologi i terrester miljö finns i (9) (10) (11) (12).

PRINCIP FÖR TESTMETODEN

4. Adulta småringmaskar exponeras för en serie koncentrationer av testkemikalien som blandats ner i syntetisk jord. Testet kan delas upp i två etapper: (a) ett preliminärt test, om inte tillräcklig information finns att tillgå, där dödligheten är den huvudsakliga endpoint som ska bedömas efter två veckors exponering och (b) ett definitivt reproduktionstest där det totala antalet avkommor som produceras av föräldradjuren samt föräldradjurens överlevnad bedöms. Varaktigheten för det definitiva testet är 6 veckor. Efter de första tre veckorna avlägsnas adulterna och morfologiska förändringar registreras. Efter ytterligare tre veckor räknas den avkomma som kläckts ur de kokonger som producerats av adulterna. Reproduktionskapaciteten hos de djur som exponerats för testkemikalien jämförs med kontrollen eller kontrollerna för att fastställa (i) den koncentation vid vilken inga verkningar observeras (NOEC) och/eller (ii) EC_x (t.ex. EC_{10}, EC_{50}) genom att använda en regressionsmodell för att beräkna den koncentration som orsakar en minskning av reproduktionskapaciteten med x %. EC_x bör ligga inom intervallet av testkoncentrationer (t.ex. EC_{10}, EC_{50}) så att EC_x interpoleras snarare än extrapoleras.

INFORMATION OM TESTKEMIKALIEN

5. Testkemikaliens vattenlöslighet, log K_{ow}, fördelningskoefficient jord/vatten (t.ex. kapitel C.18 eller C.19 i denna bilaga) och ångtryck bör helst vara kända. Helst ska det finnas ytterligare information om testkemikaliens omvandling, spridning och fördelning i jord, såsom fotolys- och hydrolyshastighet.

6. Testmetoden kan användas för kemikalier som är lösliga eller olösliga i vatten. Testkemikaliens appliceringsmetod måste dock anpassas i enlighet med detta. Testmetoden kan inte användas för flyktiga kemikalier, dvs. kemikalier för vilka Henrys konstant eller fördelningskoefficienten luft/vatten är större än ett, eller kemikalier för vilka ångtrycket överstiger 0,0133 Pa vid 25 °C.

▼M6

TESTETS GILTIGHET

7. För att testet ska vara giltigt måste följande kriterier uppfyllas för kontrollerna:

— Dödligheten hos adulter bör inte överstiga 20 % i slutet av det preliminära testet och efter de första tre veckorna av reproduktionstestet.

— Om man antar att tio adulter per kärl används i testets inledning bör i genomsnitt minst 25 juveniler per kärl ha producerats i slutet av testet.

— Variationskoefficienten för det genomsnittliga antalet avkommor bör inte vara högre än 50 % i slutet av reproduktionstestet.

Om ett test inte uppfyller ovanstående kriterier för testresultatens giltighet bör testet avslutas, såvida inte en motivering för att fortsätta med testet kan ges. Motiveringen ska ingå i testrapporten.

REFERENSKEMIKALIE

8. En referenskemikalie ska testas antingen regelbundet eller eventuellt som ett inslag i varje test för att kontrollera att testorganismernas reaktion inte har förändrats avsevärt med tiden. En lämplig referenskemikalie är karbendazim, som visat sig påverka småringmaskars överlevnad och fortplantning (13) (14). Andra kemikalier vars toxicitetsdata är välkända kan också användas. En beredning av karbendazim som har handelsbeteckningen Derosal™ och levereras av företaget AgrEvo (Frankfurt, Tyskland), och som innehåller 360 g/l (32,18 %) verksamt ämne har använts i ett ringtest (2). EC_{50}-värdet för reproduktionen som fastställdes i ringtestet var i storleksordningen 1,2 ± 0,8 mg verksamt ämne/kg torrvikt (2). Om en positiv giftekvivalent ingår i testserien används en koncentration och antalet replikat bör vara detsamma som i kontrollerna. För karbendazim rekommenderas testning av 1,2 mg verksamt ämne/kg torrvikt (testad som en flytande beredning).

BESKRIVNING AV TESTET

Utrustning

9. Testkärlen bör vara tillverkade av glas eller annat kemiskt inert material. Glasburkar (t.ex. kärlvolym: 0,20–0,25 liter, diameter: ≈ 6 cm) är lämpliga att använda. Kärlen bör ha transparenta lock (t.ex. glas eller polyeten) som utformats för att minska vattenavdunstningen samtidigt som de möjliggör gasväxling mellan jord och luft. Locken bör vara genomskinliga för att möjliggöra ljusgenomsläpplighet.

10. Dessutom behövs normal laboratorieutrustning, särskilt följande:

— torkskåp,

— stereomikroskop,

— pH-mätare och fotometer,

— en lämplig exakt våg,

— lämplig utrustning för temperaturreglering,

— lämplig utrustning för reglering av luftfuktigheten (inte nödvändigt om exponeringskärlen har lock),

— inkubator eller ett litet rum med luftkonditionering,

— pincett, krokar eller öglor,

— framkallningskärl.

Beredning av den syntetiska jorden

11. I detta test används en syntetisk jord (5) (7) med följande sammansättning (baserad på torrvikt, torkad till en konstant vikt vid 105 °C):

▼M6

— 10 % vitmosstorv (*Sphagnum*), lufttorkad och finfördelad (en partikelstorlek på 2 ± 1 mm är godtagbar). Man bör kontrollera att en jord som bereds med en färsk torvblandning är lämplig för maskodling innan den används i ett test,

— 20 % kaolinlera (kaolinithalt helst över 30 %),

— cirka 0,3–1,0 % kalciumkarbonat ($CaCO_3$, pulvriserat, av analyskvalitet) som tillsätts för att få ett pH-värde på 6,0 ± 0,5. Mängden tillsatt kalciumkarbonat beror främst på torvens kvalitet/beskaffenhet,

— ungefär 70 % lufttorkad kvartssand (beroende på vilken mängd $CaCO_3$ som krävs), främst fin sand där mer än 50 % av partiklarna har storleken 50–200 μm.

Man bör kunna visa att en artificiell jord är lämplig för odling av maskar och för att uppnå kriterierna för testresultatets giltighet innan jorden används i ett definitivt test. Det är särskilt tillrådligt att göra en sådan kontroll för att säkerställa att testutförandet inte äventyras om halten av organiskt kol i den syntetiska jorden minskar, t.ex. genom att sänka torvhalten till 4–5 % och öka sandhalten i motsvarande grad. Med en sådan minskning av halten organiskt kol kan möjligheterna till adsorption av testkemikalien till jorden (organiskt kol) minskas, och då blir testkemikalien bättre tillgänglig för maskarna. Det har visats att *Enchytraeus albidus* kan uppfylla giltighetskriterierna för reproduktion vid testning i fältjordar med en halt av organiskt kol som är lägre än den ovannämnda (t.ex. 2,7 %) (15), och det finns viss erfarenhet av att detta också kan uppnås i syntetisk jord med 5 % torv.

Anmärkning: Vid användning av naturlig jord i ytterligare tester (t.ex. senare steg) bör jordens lämplighet och uppnåendet av kriterierna för testresultatets giltighet också påvisas.

12. Jordens torra beståndsdelar blandas omsorgsfullt (t.ex. i en storskalig laboratorieblandare). Detta bör göras minst en vecka innan testet inleds. Jordblandningen ska lagras i två dagar i syfte att nå surhetsjämvikt. För bestämning av pH-värdet används en blandning av jord och en lösning med 1 M kaliumklorid (KCl) eller 0,01 M kalciumklorid ($CaCl_2$) i förhållandet 1:5 (se (16) och tillägg 3). Om marken är surare än det intervall som krävs (se punkt 11) kan detta justeras genom tillsats av lämplig mängd $CaCO_3$. Om marken är för alkalisk kan detta justeras genom tillsats av en större mängd av blandningen som avses i punkt 11, förutom att $CaCO_3$ utesluts.

13. Den syntetiska jordens maximala vattenhållningskapacitet (WHC) bestäms i enlighet med de förfaranden som beskrivs i tillägg 2. En eller två dagar innan testet inleds förhandsfuktas den torra syntetiska jorden med tillräcklig mängd avjonat vatten till dess att den har en vattenhalt som motsvarar cirka hälften av den slutliga vattenhalten, dvs. 40–60 % av maximal vattenhållningskapacitet. I början av testet delas den förhandsfuktade jorden upp i portioner som motsvarar antalet testkoncentrationer (och referenskemikalie i förekommande fall) och kontroller som används i testet. Fukthalten justeras

▼M6

till 40–60 % av maximal vattenhållningskapacitet genom tillsats av testkemikalielösningen och/eller av destillerat eller avjonat vatten (se punkterna 19–21). Fukthalten bestäms i början och i slutet av testet (genom torkning till konstant vikt vid 105 °C) och bör hållas inom det optimala intervallet för maskarnas överlevnad. En summarisk kontroll av jordens fukthalt kan göras genom att man försiktigt pressar jorden i handen. Om vattenhalten är korrekt ska små vattendroppar sippra ut mellan fingrarna.

Urval och förberedelse av försöksdjuren

14. Den rekommenderade testarten är *Enchytraeus albidus* Henle 1837 (vit ringmask), en medlem av familjen Enchytraeidae (ordning Oligochaeta, fylum Annelida). *E. albidus* är en av de största arterna av småringmaskar, med dokumenterade exemplar på upp till 35 mm längd (17) (18). *E. albidus* förekommer över hela världen och återfinns i marina, limniska och terrestra livsmiljöer på land, främst i multnande organiskt material (tång, kompost) och i sällsynta fall på ängar (9). Dess breda ekologiska tolerans och vissa morfologiska variationer tyder på att det finns olika raser.

15. *E. albidus* finns kommersiellt tillgänglig som fiskfoder. Man bör kontrollera om odlingen är kontaminerad av andra, vanligtvis mindre arter (1) (19). Om kontaminering förekommer bör alla maskar tvättas med vatten i en petriskål. Stora adulta exemplar av *E. albidus* bör därefter väljas ut (med hjälp av stereomikroskop) för att starta en ny odling, och alla andra maskar kasseras. *E. albidus* kan lätt odlas i många olika organiska material (se tillägg 4). Livscykeln för *E. albidus* är kort eftersom maskarna blir könsmogna mellan 33 dagars (vid 18 °C) och 74 dagars ålder (vid 12 °C) (1). Endast odlingar som har hållits utan problem i laboratoriet i minst fem veckor (en generation) används för testet.

16. Andra arter av släktet *Enchytraeus* är också lämpliga, t.ex. *E. buchholzi* Vejdovsky 1879 eller *E. crypticus* Westheide & Graefe 1992 (se tillägg 5). Om andra arter av släktet *Enchytraeus* används bör de identifieras tydligt och motiveringen för valet av art bör rapporteras.

17. I testerna används adulta maskar. De bör ha ägg (vita fläckar) i clitellum (gördeln), och de bör vara av ungefär samma storlek (ca 1 cm långa). Det är inte nödvändigt att synkronisera uppfödningskulturen.

18. Om småringmaskarna inte föds upp i samma jordtyp och under de förutsättningar (inklusive utfodring) som ska användas för det slutliga testet måste de acklimatiseras i minst 24 timmar och upp till 3 dagar. Ett större antal adulter än vad som krävs för att utföra testet bör inledningsvis acklimatiseras för att skadade eller på annat sätt olämpliga exemplar ska kunna kasseras. I slutet av acklimatiseringsperioden ska endast maskar som innehåller ägg och som inte uppvisar några beteendestörningar (t.ex. försöker ge sig iväg upp ur jorden) väljas ut för testet. Maskarna avlägsnas försiktigt med hjälp av urmakarpincett, krokar eller öglor och placeras i en petriskål som innehåller en mindre mängd sötvatten. Rekonstituerat sötvatten som föreslås i kapitel C.20 i denna bilaga (Reproduktionstest för *Daphnia magna*) lämpar sig bäst för detta ändamål eftersom avjonat eller avmineraliserat vatten eller kranvatten skulle kunna skada odlingen. Maskarna kontrolleras under stereomikroskop och de som inte innehåller ägg kasseras. Man måste vara noga med att avlägsna och kasta bort eventuella kvalster eller hoppstjärtar som kan ha infekterat kulturerna. Friska maskar som inte används i testet återbördas till stamkulturen.

▼M6

Beredning av testkoncentrationer

Testkemikalier som är lösliga i vatten

19. En lösning av testkemikalien bereds i avjonat vatten i tillräcklig mängd för att räcka till alla replikat av en testkoncentration. Det rekommenderas att man använder en lämplig mängd vatten för att nå önskad fukthalt, dvs. 40–60 % av maximal vattenhållningskapacitet (se punkt 13). Varje lösning av testkemikalien blandas grundligt med ett parti förhandsfuktad jord innan den tillsätts i testkärlet.

Testkemikalier som är olösliga i vatten

20. För kemikalier som inte är lösliga i vatten men som är lösliga i organiska lösningsmedel kan testkemikalien lösas upp i minsta möjliga volym i en lämplig vehikel (t.ex. aceton). Endast flyktiga lösningsmedel bör användas. Vehikeln sprejas på eller blandas med en liten mängd fin kvartssand, till exempel 2,5 g. Vehikeln avlägsnas genom avdunstning i ett dragskåp i minst 1 timme. Blandningen av kvartssand och testkemikalie tillförs den på förhand fuktade jorden och blandas omsorgsfullt efter tillsats av lämplig mängd avjonat vatten för att få den fuktighet som krävs. Den slutliga blandningen överförs till testkärlen.

21. För kemikalier som är svårlösliga i vatten och i organiska lösningsmedel blandas motsvarande 2,5 g finmald kvartssand per testkärl med den mängd testkemikalie som ger önskad testkoncentration. Blandningen av kvartssand och testkemikalie tillförs den förhandsfuktade jorden och blandas omsorgsfullt efter tillsats av lämplig mängd avjonat vatten för att få önskad fukthalt. Den slutliga blandningen fördelas mellan testkärlen. Förfarandet upprepas för varje testkoncentration, och en lämplig kontroll upprättas också.

22. Kemikalier bör normalt inte testas i koncentrationer som överstiger 1 000 mg/kg torrvikt jord. Testning vid högre koncentrationer kan dock vara nödvändig i enlighet med syftet för ett visst test.

TESTFÖRFARANDE

Testgrupper och kontroller

23. För varje koncentration av testkemikalien placeras en mängd jord som motsvarar 20 g torrvikt i testkärlet (se punkterna 19–21). Man bereder även kontroller utan testkemikalien. Foder tillsätts varje kärl i enlighet med de förfaranden som beskrivs i punkt 29. Tio maskar fördelas slumpvis till varje testkärl. Maskarna överförs försiktigt till varje testkärl och placeras på ytan av jorden, t.ex. med hjälp av urmakarpincett, krokar eller öglor. Antalet replikat för testkoncentrationer och för kontroller beror på testupplägget (se punkt 34). Testkärlen placeras slumpvis i inkubatorn och deras positioner ändras slumpvis varje vecka.

24. Om en vehikel används för applicering av testkemikalien bör man utöver testserierna även ha en kontrollserie som innehåller kvartssand som sprejats eller blandats med lösningsmedel. Lösningsmedlet eller dispergeringsmedlet bör ha samma koncentration som den som används i de testkärl som innehåller testkemikalien. Man bör ha en kontrollserie som innehåller ytterligare kvartssand (2,5 g per kärl) för kemikalier som kräver tillförsel i enlighet med de förfaranden som beskrivs i punkt 21.

▼M6

Testbetingelser

25. Testtemperaturen ska vara 20 ± 2 °C. För att minska risken för att maskar tar sig upp ur jorden ska testet utföras under kontrollerade ljus-/mörkercykler (helst 16 h ljus/8 h mörker) med en belysning på 400–800 lux i området med testkärlen.

26. För att kontrollera jordens fuktighet ska kärlen vägas vid testets början och därefter en gång i veckan. Viktförluster ska utjämnas genom tillsats av lämplig mängd avjonat vatten. Det bör noteras att förlusten av vatten kan minskas genom att man bibehåller en hög luftfuktighet (> 80 %) i inkubatorn.

27. Fukthalt och pH ska mätas i början och slutet av både det preliminära och det definitiva testet. Mätningarna bör göras i de kontroller och de behandlade jordprover (alla koncentrationer) som beretts och underhålls på samma sätt som testkulturerna men som inte innehåller maskar. Foder bör endast tillföras dessa jordprover i början av testet för att främja den mikrobiella aktiviteten. Mängden foder bör vara densamma som i testkulturerna. Det är inte nödvändigt att tillföra ytterligare foder till dessa kärl under testets gång.

Utfodring

28. Ett foder som kan livnära populationen med småringmaskar kan användas. Valsad havre, som helst ska autoklaveras före användning för att undvika kontaminering av mikroorganismer (uppvärmning går också bra), har befunnits vara ett lämpligt foder.

29. Fodret tillförs först genom att 50 mg malda havregryn blandas ned i jorden i varje kärl innan maskarna införs. Därefter tillförs födan veckovis fram till dag 21. Ingen utfodring görs på dag 28 eftersom adulterna har avlägsnats i detta skede och juvenilerna har relativt lite behov av extra foder efter denna dag. Utfodringen under testet utgörs av 25 mg malda havregryn per kärl försiktigt placerad på ytan av jorden för att undvika att skada maskarna. För att minska tillväxten av mögel bör havreflingorna grävas ner i jorden genom att man täcker dem med små mängder jord. Om fodret förblir oätet bör fodergivan minskas.

Utformning av det preliminära testet

30. Vid behov kan ett preliminärt test utföras med t.ex. fem koncentrationer av testkemikalien på 0,1, 1,0, 10, 100 och 1 000 mg/kg (torrvikt jord). Ett replikat för varje exponering och kontroll är tillräckligt.

31. Det preliminära testets varaktighet är två veckor. Vid slutet av provet bedöms maskarnas dödlighet. En mask registreras som död om den inte reagerar på mekanisk retning på främre delen. Ytterligare information rörande dödligheten kan också vara användbar för att avgöra vilket koncentrationsintervall som ska användas i det definitiva testet. Förändringar i adulternas beteende (t.ex. oförmåga att gräva ner sig i jorden, maskar ligger orörliga mot testkärlets glasvägg) och morfologi (t.ex. öppna sår) bör därför också registreras, liksom eventuell förekomst av juveniler. Det senare kan fastställas med hjälp av den färgningsmetod som beskrivs i tillägg 6.

32. Ett approximativt värde på LC_{50} kan fastställas genom beräkning av mortalitetsuppgifternas geometriska medelvärde. När man fastställer koncentrationsintervallet för det definitiva testet antas effekterna på fortplantningen vara lägre än LC_{50} med en faktor på upp till 10. Detta är dock ett empiriskt

▼M6

förhållande och i ett enskilt fall kan det skilja sig. Ytterligare iakttagelser i det preliminära testet, t.ex. förekomst av juveniler, kan bidra till att finjustera det koncentrationsintervall för testkemikalien som ska användas i det definitiva testet.

33. För att en noggrann bestämning av LC_{50} ska kunna göras rekommenderas att testet utförs med minst fyra replikat för varje koncentration av testkemikalien och ett tillräckligt antal koncentrationer för att framkalla minst fyra olika statistiskt signifikanta genomsnittliga responser på dessa koncentrationer. Ett liknande antal koncentrationer och replikat för kontrollerna ska användas när detta är tillämpligt.

Utformning av det definitiva reproduktionstestet

34. Tre utformningar föreslås på grundval av de rekommendationer som ett ringtest ger upphov till (2).

— För bestämning av NOEC bör minst fem koncentrationer i en geometrisk serie testas. Det rekommenderas att man använder fyra replikat för varje testkoncentration plus åtta kontroller. Koncentrationerna bör skilja sig åt med en faktor på högst 1,8.

— För bestämning av EC_x (t.ex. EC_{10}, EC_{50}), bör minst fem koncentrationer testas, och EC_x ska ligga innanför intervallet av testkoncentrationer så att det blir möjligt att interpolera snarare än extrapolera EC_x. Det rekommenderas att man använder minst fyra replikat för varje testkoncentration och fyra kontrollreplikat. Koncentrationernas inbördes avståndsfaktor kan variera, dvs. den kan vara mindre än eller lika med 1,8 i det förväntade effektintervallet och större än 1,8 vid högre och lägre koncentrationer.

— Ett kombinerat tillvägagångssätt möjliggör bestämning av både NOEC och EC_x. Man bör använda åtta testkoncentrationer i en geometrisk serie. Fyra replikat per exponering plus åtta kontroller rekommenderas. Koncentrationerna bör skilja sig åt med en faktor på högst 1,8.

35. Varje testkärl ska innehålla tio adulter (se punkt 23). Foder tillsätts i testbehållarna i början av testet och därefter en gång per vecka (se punkt 29) upp till och inklusive dag 21. Dag 21 genomsöks jordproven försiktigt för hand och de levande adulta maskarna undersöks och räknas, och förändringar i beteende (t.ex. oförmåga att gräva ner sig i jorden, maskar ligger orörliga mot testkärlets glasvägg) och morfologi (t.ex. öppna sår) registreras. Alla adulter avlägsnas från testkärlen och testjorden. Testjorden med de kokonger som har producerats inkuberas i ytterligare tre veckor under samma testförhållanden, förutom att utfodring sker endast dag 35 (25 mg malda havregryn per kärl).

36. Efter sex veckor räknas de nykläckta maskarna. Det rekommenderas att man använder metoden som bygger på kontrastfärgning med rött (se tillägg 6), även om andra våta (men inte varma) extraktions- och flotationstekniker (se tillägg 6) också har visat sig vara lämpliga (4) (10) (11) (20). Röd kontrastfärgning rekommenderas eftersom våt extraktion från ett jordsubstrat kan förhindras av grumlighet som orsakas av suspenderade lerpartiklar.

Toleranstest

37. Om inga effekter observeras vid den högsta koncentrationen i det preliminära testet (dvs. 1 000 mg/kg), kan reproduktionstestet utföras som ett toleranstest med 1 000 mg/kg för att visa att NOEC för reproduktion är större än detta värde.

▼M6

Sammanfattning och tidsplan för testet

38. Stegen i testet kan sammanfattas på följande sätt:

Tid	Preliminärt test	Definitivt test
Dag – 7 eller tidigare	— Bered syntetisk jord (blanda torra beståndsdelar)	— Bered syntetisk jord (blanda torra beståndsdelar)
Dag – 5	— Kontrollera pH i den syntetiska jorden — Mät jordens maximala vattenhållningskapacitet	— Kontrollera pH i den syntetiska jorden — Mät jordens maximala vattenhållningskapacitet
Dag – 5 till – 3	— Sortera maskar för acklimatisering	— Sortera maskar för acklimatisering
Dag – 3 till 0	— Låt maskarna acklimatisera sig i minst 24 timmar	— Låt maskarna acklimatisera sig i minst 24 timmar
Dag – 1	— Förhandsfukta den syntetiska jorden och fördela i partier	— Förhandsfukta den syntetiska jorden och fördela i partier
Dag 0	— Bered stamlösningar — Applicera testkemikalien — Väg testsubstratet i testkärlen — Blanda ner foder — Tillsätt maskarna — Mät jordens pH-värde och vattenhalt	— Bered stamlösningar — Applicera testkemikalien — Väg testsubstratet i testkärlen — Blanda ner foder — Tillsätt maskarna — Mät jordens pH-värde och vattenhalt
Dag 7	— Kontrollera jordens fukthalt	— Kontrollera jordens fukthalt — Utfodra
Dag 14	— Fastställ dödligheten bland adulter — Uppskatta antalet juveniler — Mät jordens pH-värde och vattenhalt	— Kontrollera jordens fukthalt — Utfodra
Dag 21		— Observera beteendet hos adulter — Avlägsna adulter — Fastställ dödligheten bland adulter — Kontrollera jordens fukthalt — Utfodra
Dag 28		— Kontrollera jordens fukthalt — Ingen utfodring
Dag 35		— Kontrollera jordens fukthalt — Utfodra
Dag 42		— Räkna juveniler — Mät jordens pH-värde och vattenhalt

▼M6

DATA OCH RAPPORTERING

Behandling av resultaten

39. Även om en översikt ges i tillägg 7 ges ingen definitiv statistisk vägledning för hur testresultaten ska analyseras i denna testmetod.

40. I det preliminära testet är den huvudsakliga endpointen dödlighet. Förändringar i adulternas beteende (t.ex. oförmåga att gräva ner sig i jorden, maskar ligger orörliga mot testkärlets glasvägg) och morfologi (t.ex. öppna sår) bör dock också registreras, liksom eventuell förekomst av juveniler. Probitanalys (21) eller logistisk regressionsanalys bör normalt användas för bestämning av LC_{50}. I de fall då denna analysmetod är olämplig (t.ex. om färre än tre koncentrationer med partiell dödlighet finns tillgängliga) kan alternativa metoder tillämpas. Exempel på sådana är glidande medelvärden (22), den modifierade Spearman-Karbermetoden (23) eller enkel interpolering (t.ex. det geometriska medelvärdet av LC_0 och LC_{100}, som beräknats genom att kvadratroten av LC_0 multiplicerats med LC_{100}).

41. I det definitiva testet är endpointen fekunditet (dvs. antalet avkommor som producerats). Liksom i det preliminära testet bör alla andra skadliga tecken registreras i slutrapporten. Den statistiska analysen gör det nödvändigt att beräkna det aritmetiska medelvärdet och standardavvikelsen per testkärl och per kontroll för reproduktionen.

42. Om en variansanalys har utförts kan standardavvikelsen s och frihetsgraderna df ersättas av den sammanlagda uppskattningen av variansen som erhållits från variansanalysen (ANOVA) respektive dess frihetsgrader – förutsatt att variansen inte är beroende av koncentrationen. I detta fall ska de enskilda varianserna i kontroll- och testenheter användas. Dessa värden beräknas normalt med hjälp av kommersiell programvara för statistik med användning av resultaten per kärl som replikat. Om det förefaller vara rimligt att slå ihop data för negativa kontroller och kontroller med lösningsmedel snarare än att testa mot en av dem bör de testas för att säkerställa att det inte finns betydande skillnader mellan dem (för lämpliga tester se punkt 45 och tillägg 7).

43. Ytterligare statistisk testning och slutsatser beror på om värdena för replikaten är normalt fördelade och enhetliga med avseende på variansen.

Uppskattning av NOEC

44. Man bör främst använda kraftfulla tester. Man bör använda information t.ex. från tidigare erfarenheter med ringtester eller andra tidigare uppgifter om huruvida data är ungefär normalt fördelade. Variansens homogenitet (homoskedasticitet) är av mer avgörande betydelse. Erfarenheter visar att variansen ofta ökar med ett ökande medelvärde. I dessa fall kan en datatransformation leda till homoskedasticitet. En sådan omvandling bör dock bygga på erfarenheterna från tidigare uppgifter i stället för på uppgifter som håller på att undersökas. Med homogena data bör flera t-tester, såsom Williams test ($\alpha = 0{,}05$, asymmetriskt) (24) (25) eller i vissa fall Dunnetts test (26) (27), utföras. När det gäller ojämn förökning bör det noteras att t-värdena i tabellen måste korrigeras i enlighet med Dunnett och Williams. Ibland ökar/minskar reaktionerna inte regelbundet på grund av stor variation. I ett sådant fall med kraftig avvikelse från monotonicitet är Dunnetts test lämpligare. Om det finns avvikelser från homoskedasticiteten kan det vara rimligt att

▼M6

närmare undersöka de möjliga effekterna på variansen för att besluta om t-testerna kan tillämpas utan att förlora mycket av sin effekt (28). Alternativt kan ett multipelt U-test tillämpas, t.ex. Bonferronis U-test enligt Holm (29), eller, när dessa data uppvisar heteroskedasticitet men i övrigt är förenliga med en bakomliggande monoton dos-respons, ett annat icke-parametriskt test (t.ex. Jonckheere-Terpstra (30) (31) eller Shirley (32) (33)), och är i allmänhet att föredra framför t-tester med ojämn varians (se även diagrammet i tillägg 7).

45. Om ett toleranstest har utförts och de nödvändiga förutsättningarna för parametriska testförfaranden (normalitet, homogenitet) är uppfyllda, kan ett parvist Students t-test användas eller i annat fall Mann och Whitneys U-testförfarande (29).

Bestämning av EC_x

46. När man beräknar EC_x-värden används medelvärdena per testkärl för regressionsanalys (linjär eller icke-linjär), efter att en lämplig dos-responsfunktion har erhållits. För maskarnas tillväxt som en kontinuerlig respons kan EC_x-värdena uppskattas genom användning av en lämplig regressionsanalys (35). Bland lämpliga funktioner för dikotoma data (mortalitet/överlevnad och antal avkommor) återfinns de normala sigmoida eller logistiska funktionerna eller Weibull-funktionen med två till fyra parametrar, varav vissa även kan uttrycka hormetiska responser. Om en dos-respons-funktion anpassas genom linjär regressionsanalys bör en signifikant determinationskoefficient (r^2) och/eller lutning konstateras med regressionsanalysen innan EC_x uppskattas genom att ett värde som motsvarar x % av genomsnittet för kontrollen infogas i den ekvation som utgör resultatet av regressionsanalysen. De 95-procentiga konfidensgränserna beräknas enligt Fieller (hänvisning i Finney (21)) eller andra lämpliga moderna metoder.

47. Alternativt kan responsen uttryckas som en procentandel eller en andel av den modellparameter som tolkas som den genomsnittliga responsen för kontrollen. I dessa fall kan den normala (logistiska, Weibullska) sigmoida kurvan ofta lätt anpassas till resultaten med hjälp av probitregressionsförfarandet (21). I dessa fall måste viktningsfunktionen justeras för metriska responser i enlighet med Christensen (36). Om hormesis har iakttagits bör probitanalysen dock ersättas med en logistisk funktion eller en Weibullfunktion, i båda fallen med fyra parametrar, anpassad genom ett icke-linjärt regressionsförfarande (36). Om en lämplig dos-responsfunktion inte kan anpassas till data kan man använda alternativa metoder för att uppskatta EC_x och dess konfidensgränser, t.ex. glidande medelvärden efter Thompson (22) och det modifierade Spearman-Karberförfarandet (23).

TESTRAPPORT

48. Testrapporten ska innehålla följande uppgifter:

Testkemikalie:

— fysikalisk form och i tillämpliga fall fysikalisk-kemiska egenskaper (t.ex. vattenlöslighet, ångtryck),

— kemisk identifiering av testkemikalien i enlighet med IUPAC-nomenklatur, CAS-nummer, sändning, parti, strukturformel och renhet,

— provets utgångsdatum.

Testade arter:

— de använda försöksdjuren: art, vetenskapligt namn, källa och uppfödningsbetingelser.

Testbetingelser:

— ingredienser till och beredning av den syntetiska jorden,

▼M6

— appliceringsmetod för testkemikalien,

— beskrivning av testbetingelserna, inklusive temperatur, vattenhalt, pH-värde etc.,

— fullständig beskrivning av experimentets utformning och förfaranden.

Testresultat:

— dödligheten bland adulter efter två veckor samt antal juveniler i slutet av det preliminära testet,

— dödligheten bland adulter efter tre veckors exponering och fullständiga uppgifter om juvenilerna i slutet av det definitiva testet,

— alla observerade fysiska eller patologiska symtom eller beteendeförändringar hos testorganismerna,

— LC_{50}, NOEC och/eller EC_x (t.ex. EC_{50}, EC_{10}) för reproduktionen om vissa av dem är tillämpliga med konfidensintervallen, och en kurva som representerar den anpassade modell som har använts för beräkningen, samt alla uppgifter och observationer som kan vara till nytta vid tolkningen av resultaten.

Avvikelser från de förfaranden som beskrivs i denna testmetod och ovanliga händelser under testets gång.

LITTERATUR

(1) Römbke, J. (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) Römbke J. och Moser, T. (1999). Organisation and Performance of an International Ringtest for the Validation of the Enchytraeid Reproduction Test. UBA-Texte 4/99, s. 150 + 223.

(3) Westheide, W. och Bethge-Beilfuss, D. (1991). The sublethal enchytraeid test system: guidelines and some results, i: Modern Ecology: Basic and Applied Aspects. Esser, G. och Overdieck, D. (red.), s. 497–508. Elsevier, Amsterdam.

(4) Dirven-Van Breemen, E., Baerselmann, R. och Notenboom, J. (1994). Onderzoek naar de Geschiktheid van de Potwormsoorten *Enchytraeus albidus* en *Enchytraeus crypticus* (Oligochaeta, Annelida) i Bodemecotoxicologisch Onderzoek. RIVM Rapport nr 719102025, s. 46.

(5) Kapitel C.8 i denna bilaga: Toxicitet för daggmaskar.

(6) ISO (Internationella standardiseringsorganisationen) (1999). Markundersökningar – Föroreningars effekt på daggmaskar (*Eisenia fetida*) – Del 1: Bestämning av akut toxicitet med artificiell jord, nr 11268-1. ISO, Genève.

(7) ISO (Internationella standardiseringsorganisationen) (1999). Markundersökningar – Föroreningars effekt på daggmaskar (*Eisenia fetida*) – Del 2: Bestämning av effekter på reproduktion, nr 11268-2. ISO, Genève.

(8) Rundgren, S. och A. K. Augustsson. (1998). Test on the enchytraeid *Cognettia sphagnetorum* (Vejdovsky 1877). I: Løkke, H. och C. A. M. Van Gestel, Handbook of soil invertebrate toxicity tests. John Wiley and Sons, Chichester, 73–94.

(9) Kasprzak, K. (1982). Review of enchytraeid community structure and function in agricultural ecosystems. Pedobiologia 23, 217–232.

(10) Römbke, J. (1996). Enchytraeen (Oligochaeta) als Bioindikator, UWSF – Z. Umweltchem. Ökotox. 7, 246–249.

(11) Dunger, W. och Fiedler, H. J. (1997). Methoden der Bodenbiologie. G. Fischer Verlag, Stuttgart, New York.

▼M6

(12) Didden, W. A. M. (1994). Ecology of terrestrial Enchytraeidae. Pedobiologia 37, 2–29.

(13) Becker, H. (1991). Bodenorganismen – Prüfungskategorien der Forschung. UWSF – Z. Umweltchem. Ökotox. 3, 19–24.

(14) Römbke, J. och Federschmidt, A. (1996). Effects of the fungicide Carbendazim on Enchytraeidae in laboratory and field tests, Newsletter on Enchytraeidae 4, 79–96.

(15) Römbke, J., Riepert, F. och Achazi R. (2000). Enchytraeen als Testorganismen. I: Toxikologische Beurteilung von Böden. Heiden, S., Erb, R., Dott, W. och Eisentraeger, A. (red.). Spektrum Verl., Heidelberg. 59–81.

(16) ISO (Internationella standardiseringsorganisationen) (1994). Markundersökningar – Bestämning av pH, nr 10390. ISO, Genève.

(17) Bell, A. W. (1958). The anatomy of *Enchytraeus albidus*, with a key to the species of the genus *Enchytraeus*. Ann. Mus. Novitat. 1902, 1–13.

(18) Nielsen, C.O. och Christensen, B. (1959). The Enchytraeidae, critical revision and taxonomy of European species. Natura Jutlandica 8–9, 1–160.

(19) Bouguenec, V. och Giani, N. (1987). Deux nouvelles especes d'*Enchytraeus* (Oligochaeta, Enchytraeidae) et rediscription d'*E. bigeminus*. Remarques sur le genre *Enchytraeus*. Ann. Limnol. 23, 9–22.

(20) Korinkova, J. och Sigmund, J. (1968). The colouring of bottom-fauna samples before sorting, Vestnik Ceskoslovensko Spolecnosti Zoologicke 32, 300–305.

(21) Finney D. J. (1971). Probit Analysis (tredje upplagan), s. 19–76. Cambridge Univ. Press.

(22) Finney D. J. (1978). Statistical Method in Biological Assay. Charles Griffin & Company Ltd, London.

(23) Hamilton, M. A., R. C. Russo och R. V. Thurston. (1977). Trimmed Spearman-Karber Method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. Environ. Sci. Technol. 11:7, 714–719; korrigering i Environ. Sci. Technol. 12 (1998), 417.

(24) 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.

(25) Williams, D. A., (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics, 28, 519–531.

(26) Dunnett, C. W., (1955). A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. Amer. Statist. Ass. J. 50, 1096–1121.

(27) Dunnett, C. W., (1964) New Tables for Multiple Comparisons with a Control. Biometrics, 20, 482–491.

(28) Hoeven, N. van der, (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) Holm, S. (1979): A simple sequentially rejective multiple test procedure. Scand. J. Statist. 6, 65–70.

(30) Jonckheere, A. R. (1954). A Distribution-free k-Sample Test Against Ordered Alternatives, Biometrika 41, 133–145.

(31) Terpstra, T. J. (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) Shirley, E. A. (1979). The comparison of treatment to control group means in toxicology studies, Applied Statistics 28, 144–151.

▼**M6**

(33) Williams, D. A. (1986). A Note on Shirley's Nonparametric Test for Comparing Several Dose Levels with a Zero-Dose Control, Biometrics 42, 183–186.

(34) Sokal, R. R. och F. J. Rohlf. (1981). Biometry. The Principle and practice of statistics in biological research. Andra upplagan. W. H. Freeman and Company. New York.

(35) Christensen, E.R. (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. Water Research 18, 213–221.

(36) Van Ewijk, P. H. och J. A. Hoekstra. (1994). Calculation of the EC50 and its confidence interval when sub-toxic stimulus is present. Ecotox, Environ. Safety. 25, 25–32.

▼M6

Tillägg 1

Definitioner

I denna testmetod gäller följande definitioner:

Kemikalie: ett ämne eller en blandning.

EC_x (koncentration som orsakar x % effekt): den koncentration som orsakar en x-procentig effekt på testorganismerna efter en given exponeringstid jämfört med ett kontrollprov. I detta test uttrycks effektkoncentrationerna som testkemikaliens vikt per torrvikt testjord.

LC_0 (letal koncentration 0 %): den koncentration av testkemikalien som inte orsakar någon av de exponerade testorganismernas död under en given tidsperiod. I detta test uttrycks LC_0-värdet som testkemikaliens vikt per torrvikt testjord.

LC_{50} (letal koncentration 50 %): den koncentration av testkemikalien som orsakar 50 % av de exponerade testorganismernas död under en given tidsperiod. I detta test uttrycks LC_{50}-värdet som testkemikaliens vikt per torrvikt testjord.

LC_{100} (letal koncentration 100 %): den koncentration av testkemikalien som orsakar alla de exponerade testorganismernas död under en given tidsperiod. I detta test uttrycks LC_{100}-värdet som testkemikaliens vikt per torrvikt testjord.

Lägsta koncentration med observerad effekt (LOEC): den lägsta koncentrationen av testkemikalien som har en statistiskt signifikant effekt ($p < 0,05$). I detta test uttrycks LOEC-värdet som testkemikaliens vikt per torrvikt testjord. Alla testkoncentrationer som överstiger LOEC bör normalt uppvisa en effekt som statistiskt skiljer sig från kontrollen. Eventuella avvikelser från detta när man fastställer LOEC måste motiveras i testrapporten.

Nolleffektkoncentrationen (NOEC): den högsta koncentration av testkemikalien omedelbart under LOEC-värdet vid vilken ingen effekt observeras. I detta test har en halt som motsvarar NOEC ingen statistiskt signifikant effekt ($p < 0,05$) efter en given exponeringstid jämfört med ett kontrollprov.

Reproduktionstakt: det genomsnittliga antalet avkommor som producerats per ett antal adulter under testperioden.

Testkemikalie: varje ämne eller blandning som testas med denna testmetod.

▼M6

Tillägg 2

Fastställande av den maximala vattenhållningskapaciteten

Bestämning av den syntetiska jordens vattenhållningskapacitet

Följande metod har visat sig vara lämplig. Den beskrivs i bilaga C till ISO DIS 11268-2.

Samla in en fastställd kvantitet (t.ex. 5 g) testjordsubstrat med hjälp av en lämplig anordning (jordborr med rör osv.). Täck botten av röret med en bit filterpapper och fyll det med vatten. Placera det därefter på en ställning i ett vattenbad. Röret bör gradvis nedsänkas i vattnet tills vattenytan är ovanför jordytan. Det bör därefter lämnas i vattnet i cirka 3 timmar. Eftersom allt vatten som absorberas av jordens kapillärer inte kan hållas kvar bör jordprovet dräneras i 2 timmar genom att röret placeras på en bädd av mycket fuktig finmald kvartssand i ett slutet kärl (för att förhindra uttorkning). Provet bör sedan torkas till en konstant vikt vid 105 °C och vägas. Vattenhållningskapaciteten (WHC) ska beräknas enligt följande:

$$\mathrm{WHC(i\ \%\ av\ torrvikten)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

där

S = vattenmättat substrat + rörets vikt + filterpapprets vikt

T = emballagevikt (rörets vikt + filterpapprets vikt)

D = substratets torrvikt

HÄNVISNINGAR:

ISO (Internationella standardiseringsorganisationen) (1999). Markundersökningar – Föroreningars effekt på daggmaskar (*Eisenia fetida*). Del 2: Bestämning av effekter på reproduktion, nr 11268-2. ISO, Genève.

▼M6

Tillägg 3

Bestämning av jordens ph-värde

Följande metod för bestämning av pH-värdet i ett jordprov bygger på beskrivningen i ISO 10390 (Markundersökningar – Bestämning av pH).

En bestämd mängd jord torkas i rumstemperatur i minst 12 timmar. En suspension av jorden (som innehåller minst 5 gram jord) bereds därefter i fem gånger sin volym med antingen 1 M kaliumklorid (KCl) av analyskvalitet eller 0,01 M kalciumkloridlösning ($CaCl_2$) av analyskvalitet. Suspensionen skakas därefter omsorgsfullt i fem minuter. Efter skakning får suspensionen stå och klarna i minst 2 timmar men högst 24 timmar. Vätskefasens pH mäts sedan med en pH-mätare som före varje mätning kalibrerats med lämpliga buffertlösningar (t.ex. pH 4,0 och 7,0).

HÄNVISNINGAR:

ISO (Internationella standardiseringsorganisationen) (1994). Markundersökningar – Bestämning av pH, nr 10390. ISO, Genève.

▼M6

Tillägg 4

Odlingsförhållanden för *Enchytraeus* sp.

Småringmaskar av arten *Enchytraeus albidus* (liksom andra *Enchytraeus*-arter) kan odlas i stora plastlådor (t.ex. 30 × 60 × 10 cm) fyllda med en blandning av syntetisk jord och naturlig, okontaminerad trädgårdsjord i förhållandet 1:1. Kompostmaterial bör undvikas eftersom det kan innehålla giftiga kemikalier såsom tungmetaller. Fauna bör avlägsnas från jorden före användning (t.ex. genom djupfrysning). Ett substrat som består endast av syntetisk jord kan också användas men reproduktionstakten kan vara lägre än den som kan uppnås med ett blandat jordsubstrat. Det substrat som används för odling bör ha pH 6,0 ± 0,5.

Kulturen förvaras mörkt vid en temperatur på 15–20 ± 2 °C. Temperaturen får inte överstiga 23 °C. Jorden ska hållas fuktig men får inte bli våt. Fukthalten är lämplig om det sipprar fram små vattendroppar mellan fingrarna när jorden pressas försiktigt i handen. Man måste undvika att anoxiska förhållanden utvecklas genom att se till att odlingsbehållarnas lock möjliggör tillräckligt gasutbyte med atmosfären. Jorden luckras försiktigt varje vecka för att underlätta luftning.

Maskarna kan utfodras med havreflingor. Havreflingorna bör förvaras i slutna kärl och autoklaveras eller hettas upp före användning för att undvika angrepp av mjölkvalster (t.ex. *Glyzyphagus* sp., *Astigmata*, *Acarina*) eller rovkvalster (t.ex. *Hypoaspis* (*Cosmolaelaps*) *miles*, *Gamasida*, *Acarina*). Efter värmebehandlingen bör flingorna malas så att de enkelt kan spridas på jordytan. Havreflingorna kan då och då kompletteras med vitaminer, mjölk och torskleverolja. Andra lämpliga foderkällor är bagerijäst och fiskfodret TetraMin.

Utfodring sker ungefär två gånger i veckan. En lämplig mängd havreflingor strös på jordytan eller blandas omsorgsfullt ner i substratet när jorden luckras upp för att underlätta luftning. Den absoluta mängden foder som ges beror på antalet maskar i substratet. Mängden foder bör ökas om allt äts upp inom en dag efter utfodring. Omvänt gäller att om fodret ligger kvar på markytan vid den andra utfodringen (en vecka senare) bör mängden foder minskas. Foder som är angripet av svamp avlägsnas och ersätts. Efter tre månader överförs maskarna till ett nyberett substrat.

Odlingsförhållandena anses vara tillfredsställande om maskarna: (a) inte försöker ta sig upp ur jordsubstratet, (b) rör sig snabbt genom jorden, (c) har en glansig yta utan vidhäftande jordpartiklar, (d) har en mer eller mindre vitaktig färg, (e) är av varierande ålder i odlingarna och (f) förökar sig kontinuerligt.

▼M6

Tillägg 5

Testförfarande med andra *Enchytraeus*-arter

Val av art

Andra arter än *E. albidus* kan användas, men testförfarandet och giltighetskriterierna bör anpassas i enlighet med detta. Eftersom många *Enchytraeus*-arter är lätt tillgängliga och kan hållas på ett tillfredsställande sätt i laboratoriemiljö, är det viktigaste kriteriet för urval av andra arter än *E. albidus* artens ekologiska betydelse och dessutom likvärdig känslighet. Det kan också finnas formella skäl för ett byte av arter. I länder där *E. albidus* inte förekommer och inte kan importeras (t.ex. på grund av karantäntvång) är det till exempel nödvändigt att använda en annan *Enchytraeus*-art.

Exempel på lämpliga alternativa arter

— *Enchytraeus crypticus* (Westheide & Graefe 1992): Under de senaste åren har denna art ofta använts i ekotoxikologiska studier eftersom den är lätt att odla och testa. Den är dock liten, och detta gör hanteringen svårare jämfört med *E. albidus* (särskilt i de skeden som föregår kontrastfärgningen). *E. crypticus* existens på fältet har inte med säkerhet kunnat bekräftas, eftersom den endast har beskrivits i daggmaskodlingar. Dess ekologiska krav är därför inte kända.

— *Enchytraeus buchholzi* (Vejdovsky 1879): Detta namn omfattar förmodligen en grupp närbesläktade arter som är svåra att särskilja morfologiskt. Dess användning för testning rekommenderas inte förrän man kan fastställa arttillhörigheten för de exemplar som används i testet. *E. buchholzi* brukar återfinnas på ängsmark och i störda områden såsom vägkanter.

— *Enchytraeus luxuriosus*: Denna art var ursprungligen känd som *E. ”minutus”*, men har nyligen beskrivits (1). Den upptäcktes av U. Graefe (Hamburg) på en äng nära St. Peter-Ording (Schleswig-Holstein, Tyskland). *E. luxuriosus* är ungefär hälften så stor som *E. albidus* men är större än övriga arter som diskuteras här och kan därför vara ett bra alternativ till E. albidus.

— *Enchytraeus bulbosus* (Nielsen & Christensen 1963): Denna art har hittills rapporterats från tyska och spanska mineraljordar, där den är allmän men vanligtvis inte rikt förekommande. I jämförelse med andra små arter av detta släkte är den relativt lätt att identifiera. Ingenting är känt om dess beteende i laboratorieförsök eller dess känslighet för kemikalier. Den har dock visat sig vara lätt att odla (E. Belotti, personlig kommunikation).

Uppfödningsförhållanden

Alla *Enchytraeus*-arterna kan odlas i samma substrat som används för *E. albidus*. Deras ringa storlek innebär att odlingskärlen kan vara mindre och att samma foder kan användas men med justerad portionsstorlek. Livscykeln för dessa arter är kortare än för *E. albidus* och utfodringen bör ske oftare.

Testbetingelser

Testbetingelserna är i allmänhet desamma som de som gäller för *E. albidus*, med följande undantag:

— storleken på testkärlet kan (men behöver inte) vara mindre,

— reproduktionstestets varaktighet kan (men behöver inte) vara kortare, dvs. fyra i stället för sex veckor, men det preliminära testets varaktighet bör inte förändras,

— mot bakgrund av juvenilernas ringa storlek rekommenderas kontrastfärgning å det bestämdaste för fastställande av antalet,

— det kriterium för testresultatets giltighet som utgörs av ”antalet juveniler per testkärl i kontrollen” bör ändras till ”50”.

▼**M6**

HÄNVISNINGAR

(1) Schmelz, R. M. och Collado, R. (1999). *Enchytraeus luxuriosus* sp.nov., a new terrestrial oligochaete species (Enchytraeidae, Clitellata, Annelida). Carolinea 57, 93–100.

▼M6

Tillägg 6

Detaljerad beskrivning av extraktionstekniker

Kontrastfärgning med färgämnet Rose Bengal

Denna metod, som ursprungligen togs fram för limnologiska ändamål (1), föreslogs från början för bestämning av antalet juveniler i reproduktionstestet för småringmaskar av W. de Coen (Gents universitet, Belgien). Oberoende av detta utvecklades en modifierad version (Rose Bengal blandas med formaldehyd i stället för etanol) av RIVM Bilthoven (2) (3).

I slutet av det definitiva testet (dvs. efter sex veckor), överförs jorden i testkärlen till en grund behållare. Ett Bellaplast-kärl eller ett framkallningskärl med räfflad botten är användbart för detta ändamål, eftersom ”revbenen” begränsar maskarnas rörelser inom undersökningsområdet. Juvenilerna fixeras med etanol (ca 5 ml per replikat). Kärlen fylls därefter med ett vattenskikt på 1–2 cm. Några droppar (200–300 µl) av färgämnet Rose Bengal (1 % lösning i etanol) tillsätts (0,5 % eosin är ett alternativ) och de två beståndsdelarna blandas noggrant. Efter 12 timmar kommer maskarna att ha färgats röda och bör vara lätta att räkna eftersom de ligger på substratets yta. Alternativt kan substrat/alkohol-blandningen tvättas genom en 0,250 mm sikt innan maskarna räknas. Genom detta förfarande kommer kaoliniten, torven och en del av sanden att sköljas bort och de rödaktiga maskarna blir lättare att se och räkna. Linser med belysning (linsstorlek minst 100 x 75 mm med en förstoringsfaktor på 2 till 3x) underlättar också räkningen.

Kontrastfärgningen minskar den tid det tar att räkna maskarna till några minuter per kärl och som vägledning bör det ta högst två dagar för en person att bedöma alla kärlen från ett test.

Våtextraktion

Våtextraktionen bör inledas omedelbart testets slut. Jorden från varje kärl placeras i plastsiktar med en maskstorlek på ca 1 mm. Siktarna placeras sedan över plastskålar utan att vidröra botten. Skålarna fylls noggrant med vatten tills proven i siktarna befinner sig helt under vattenytan. För att säkerställa en extraktionsgrad på mer än 90 % av de befintliga maskarna bör en extraktionsperiod på 3 dagar vid 20 ± 2 °C användas. I slutet av extraktionsperioden avlägsnas siktarna och vattnet (bortsett från en liten mängd) hälls långsamt av, utan att störa sedimentet i skålarnas botten. Plastskålarna skakas sedan lätt för att suspendera sedimentet i det överliggande vattnet. Vattnet hälls i en petriskål, och när jordpartiklarna har sjunkit till botten kan småringmaskarna identifieras, avlägsnas och räknas genom användning av ett stereomikroskop och en mjuk stålpincett.

Flotation

En metod som bygger på flotation har beskrivits i en not av R. Kuperman (4). Efter det att innehållet i kärlet har fixerats med etanol dränks jorden med Ludox (AM-30 kolloidal kiseldioxid, 30 viktprocent suspension i vatten) upp till 10 till 15 mm över jordytan. Efter grundlig blandning av jorden med flotationsmedlet i 2–3 minuter kan juveniler som flyter på ytan lätt räknas.

HÄNVISNINGAR

(1) Korinkova, J. och Sigmund, J. (1968). The colouring of bottom-fauna samples before sorting, Vestnik Ceskoslovensko Spolecnosti Zoologicke 32, 300–305.

▼**M6**

(2) Dirven-Van Breemen, E., Baerselmann, R. och Notenboom, J. (1994). Onderzoek naar de Geschiktheid van de Potwormsoorten *Enchytraeus albidus* en *Enchytraeus crypticus* (*Oligochaeta*, *Annelida*) in Bodemecotoxicologisch Onderzoek. RIVM Rapport nr 719102025. 46 s.

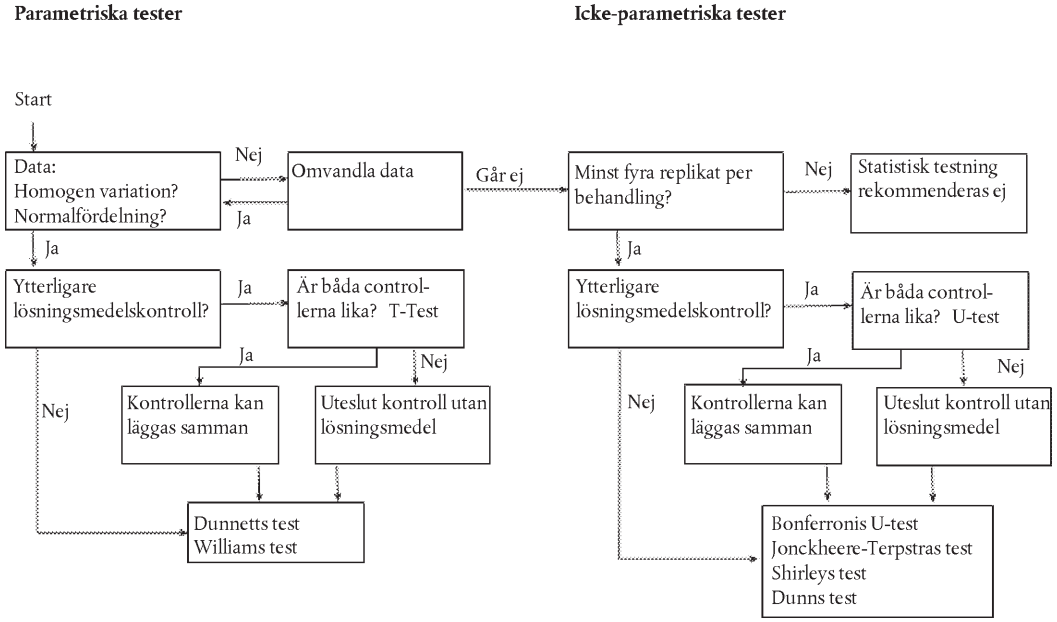
(3) Posthuma, L., Baerselmann, R., Van Veen, R. P. M. och Dirven-Van Breemen, E. M. (1997). Single and joint toxic effects of copper and zinc on reproduction of *Enchytraeus crypticus* in relation to sorption of metals in soils. Ecotox. Envir. Safety 38, s. 108–121.

(4) Phillips, C. T., Checkai, R. T. och Kuperman, R. G. (1998). An alternative to the O'Connor Method for Extracting Enchytraeids from Soil. SETAC:s 19:e årsmöte, Charlotte, USA. Abstract Book No. PMP069, s. 157.

▼M6

Tillägg 7

Översikt över de statistiska dataanalyserna (bestämning av NOEC)



▼M6

C.33. REPRODUKTIONSTEST FÖR DAGGMASKAR (*EISENIA FETIDA* OCH *EISENIA ANDREI*)

INLEDNING

1. Denna testmetod motsvarar OECD:s testriktlinje (TG) 222 (2004). Den är utformad för att användas för bestämning av effekterna av kemikalier i jord på reproduktionskapaciteten (och andra subletala endpoints) hos daggmaskar av arten *Eisenia fetida* (Savigny 1826) eller *Eisenia andrei* (Andre 1963) (1) (2). Testet har ringtestats (3). Det finns en testmetod för det akuta toxicitetstestet för daggmaskar (4). Ett antal andra internationella och nationella riktlinjer för test avseende kronisk toxicitet och akut toxicitet för daggmaskar har offentliggjorts (5) (6) (7) (8).

2. *Eisenia fetida* och *Eisenia andrei* anses vara representativa för markfaunan och för daggmaskar i synnerhet. Bakgrundsinformation om daggmaskarnas ekologi och deras användning för ekotoxikologisk testning finns att tillgå (7) (9) (10) (11) (12).

PRINCIP FÖR TESTMETODEN

3. Adulta daggmaskar exponeras för en serie koncentrationer av testkemikalien antingen nerblandad i jorden eller, när det gäller bekämpningsmedel, applicerad i eller på jorden med förfaranden som är förenliga med kemikaliens användning. Appliceringsmetoden är särskilt utvald för testets syfte. Testkoncentrationsintervallet väljs ut så att det omfattar koncentrationer som kan orsaka både letala och subletala effekter under en period på åtta veckor. Dödligheten och effekterna på de adulta maskarnas tillväxt bestäms efter fyra veckors exponering. Adulterna avlägsnas då ur jorden och reproduktionseffekterna utvärderas efter ytterligare fyra veckor genom att antalet juveniler i jorden räknas. Reproduktionskapaciteten hos de maskar som exponerats för testkemikalien jämförs med kontrollen eller kontrollerna för att fastställa (i) den koncentration vid vilken inga verkningar observeras (NOEC) och/eller (ii) EC_x (t.ex. EC_{10}, EC_{50}) genom att använda en regressionsmodell för att beräkna den koncentration som orsakar en minskning av reproduktionskapaciteten med x %. EC_x bör ligga innanför intervallet av testkoncentrationer (t.ex. EC_{10}, EC_{50}) så att EC_x interpoleras snarare än extrapoleras (se tillägg 1 för definitioner).

INFORMATION OM TESTKEMIKALIEN

4. Följande uppgifter om testkemikalien bör finnas tillgängliga för att vara till hjälp vid utformningen av lämpliga testförfaranden:

   — vattenlöslighet,

   — log K_{ow},

   — ångtryck,

   — information om omvandling, spridning och fördelning i miljön, där så är möjligt (t.ex. fotolys- och hydrolyshastighet om detta är relevant för appliceringsmodellen).

5. Denna testmetod kan användas för alla kemikalier, oberoende av deras vattenlöslighet. Testmetoden kan inte användas för flyktiga kemikalier, vilket här definieras som kemikalier för vilka Henrys konstant eller fördelningskoefficienten luft/vatten är större än ett, eller för kemikalier med ångtryck som överstiger 0,0133 Pa vid 25 °C.

6. Ingen hänsyn tas i denna testmetod till eventuell nedbrytning av testkemikalien under testperioden. Följaktligen kan man inte förutsätta att exponeringskoncentrationernas ursprungliga värden kommer att bibehållas under hela testet. Kemiska analyser av testkemikalien i början och slutet av testet rekommenderas i dessa fall.

▼M6

REFERENSKEMIKALIEN

7. Referenskemikaliens NOEC eller EC_x måste fastställas för att säkerställa att testbetingelserna i laboratorium är tillräckligt goda och för att kontrollera att testorganismernas respons inte ändras statistiskt över tiden. Det är lämpligt att testa en referenskemikalie minst en gång per år eller, om tester utförs mer sällan, parallellt med fastställandet av testkemikaliens toxicitet. Karbendazim och benomyl är lämpliga referenskemikalier som har visat sig påverka reproduktionen (3). Signifikanta effekter bör kunna iakttas mellan (a) 1 och 5 mg verksamt ämne/kg torrvikt eller (b) 250 och 500 g/ha eller 25 och 50 mg/m^2. Om en positiv giftekvivalent ingår i testserien används en koncentration och antalet replikat bör vara detsamma som i kontrollerna.

TESTETS GILTIGHET

8. Följande kriterier bör uppfyllas i kontrollerna för att testresultatet ska anses vara giltigt:

— varje replikat (innehållande tio adulter) ska ha producerat ≥ 30 juveniler i slutet av testet,

— variationskoefficienten för reproduktionen ska vara ≤ 30 %,

— dödligheten hos adulter under testets första fyra veckor ska vara ≤10 %.

Om ett test inte uppfyller ovanstående kriterier för testresultatens giltighet bör testet avslutas, såvida inte en motivering för att fortsätta med testet kan ges. Motiveringen ska anges i rapporten.

BESKRIVNING AV TESTET

Utrustning

9. Man bör använda testbehållare av glas eller annat kemiskt inert material med cirka 1–2 liters kapacitet. Behållarna ska ha en tvärsnittsarea på ungefär 200 cm^2 så att man får ett fuktigt substrat med ett djup på omkring 5–6 cm när 500–600 g torrvikt substrat tillsätts. Behållarens lock bör vara konstruerat så att det möjliggör gasutbyte mellan substratet och atmosfären samt tillgång till ljus (t.ex. genom att locket är perforerat och genomskinligt), samtidigt som det förhindrar maskarna från att ta sig ut. Om den använda mängden testsubstrat är betydligt större än 500–600 g per testbehållare bör antalet maskar ökas i proportion till detta.

10. Dessutom behövs normal laboratorieutrustning, särskilt följande:

— torkskåp,

— stereomikroskop,

— pH-mätare och fotometer,

— en lämplig exakt våg,

— lämplig utrustning för temperaturreglering,

— lämplig utrustning för reglering av luftfuktigheten (inte nödvändigt om exponeringskärlen har lock),

— inkubator eller ett litet rum med luftkonditionering,

— pincett, krokar eller öglor,

— vattenbad.

▼M6

Beredning av den syntetiska jorden

11. Syntetisk jord används i detta test (5) (7) med följande sammansättning (baserat på torrvikt, torkad till en konstant vikt vid 105 °C):

— 10 % vitmosstorv (*Sphagnum*) (så nära pH 5,5–6,0 som möjligt, utan synliga plantrester, finfördelad, torkad till den uppmätta vattenhalten),

— 20 % kaolinlera (kaolinithalt helst över 30 %),

— 0,3–1,0 % kalciumkarbonat ($CaCO_3$, pulvriserat, av analyskvalitet) för att erhålla ett initialt pH-värde på 6,0 ± 0,5,

— 70 % lufttorkad kvartssand (beroende på mängden $CaCO_3$), främst fin sand där mer än 50 % av partiklarna har storleken 50–200 μm.

Anmärkning 1: Den mängd $CaCO_3$ som krävs beror på beståndsdelarna i jordsubstratet inklusive foder, och bör bestämmas genom mätning av delprov av jorden omedelbart före testet påbörjas. pH-värdet mäts i ett blandat prov med 1 M kaliumkloridlösning (KCl) eller 0,01 M kalciumkloridlösning ($CaCl_2$) (13).

Anmärkning 2: Halten av organiskt kol i den syntetiska jorden kan minskas, t.ex. genom att sänka torvhalten till 4–5 % och öka sandhalten i motsvarande grad. Med en sådan minskning av halten organiskt kol kan möjligheterna till adsorption av testkemikalien till jorden (organiskt kol) minskas, och då blir testkemikalien bättre tillgänglig för maskarna. Det har visats att *Eisenia fetida* kan uppfylla giltighetskriterierna för reproduktion vid testning i fältjordar med lägre halt av organiskt kol (t.ex. 2,7 %) (14), och det finns erfarenhet av att detta också kan uppnås i syntetisk jord med 5 % torv. Det är inte nödvändigt att, innan den syntetiska jorden används i ett definitivt test, påvisa dess lämplighet för att testet ska uppfylla giltighetskriterierna såvida inte torvhalten sänks mer än vad som anges ovan.

Anmärkning 3: Vid användning av naturlig jord i ytterligare tester (t.ex. senare steg) bör jordens lämplighet och uppnåendet av kriterierna för testresultatets giltighet också påvisas.

12. Jordens torra beståndsdelar blandas omsorgsfullt (t.ex. i en storskalig laboratorieblandare) i ett väl ventilerat område. Innan testet inleds fuktas den torra syntetiska jorden med tillräcklig mängd avjonat vatten till dess att den har en vattenhalt som motsvarar cirka hälften av den slutliga vattenhalten, dvs. 40–60 % av maximal vattenhållningskapacitet (motsvarande 50 ± 10 % torrvikt). Resultatet av detta blir ett substrat som inte har stående eller obundet vatten när det pressas i handen. Den syntetiska jordens maximala vattenhållningskapacitet (WHC) bestäms i enlighet med de förfaranden som beskrivs i tillägg 2, ISO 11274 (15) eller motsvarande EU-standard.

13. Om testkemikalien appliceras på markytan eller blandas ner i jorden utan vatten kan den slutliga mängden vatten blandas ner i den syntetiska jorden när jorden bereds. Om testkemikalien blandas ner i jorden tillsammans med en del vatten kan ytterligare vatten tillsättas tillsammans med testkemikalien (se punkt 19).

14. Jordens fukthalt bestäms i början och i slutet av testet i enlighet med ISO 11465 (16) eller motsvarande EU-standard, och markens pH-värde i enlighet med tillägg 3 eller ISO 10390 (13) eller motsvarande EU-standard. Dessa bestämningar ska utföras på ett prov med kontrolljord och ett jordprov med

▼M6

varje testkoncentration. Jordens pH-värde bör inte justeras när sura och basiska kemikalier testas. Vattenhalten bör övervakas under hela testet genom att behållarna vägs med jämna mellanrum (se punkt 26 och 30).

Urval och förberedelse av försöksdjuren

15. Den art som används i testet är *Eisenia fetida* eller *Eisenia andrei* (1) (2). För att påbörja testet behövs adulta maskar som är mellan två månader och ett år och som är försedda med clitellum (gördel). Maskarna bör väljas ut från en synkroniserad kultur med en relativt homogen åldersstruktur (tillägg 4). Individerna i en testgrupp får inte variera i ålder med mer än 4 veckor.

16. De utvalda maskarna bör acklimatiseras under minst en dag med den typ av syntetiskt jordsubstrat som används i testet. Under denna period bör maskarna utfodras med samma foder som används i testet (se punkterna 31–33).

17. Grupper med tio maskar vägs individuellt, och grupperna tilldelas sedan slumpvis testbehållare vid testets början. Maskarna tvättas före vägningen (med avjonat vatten), och överflödigt vatten avlägsnas genom att maskarna under en kort stund placeras på filterpapper. De enskilda maskarnas våtvikt bör vara 250–600 mg.

Beredning av testkoncentrationer

18. Två metoder för applicering av testkemikalien kan användas: testkemikalien kan blandas ner i jorden (se punkterna 19–21) eller appliceras på jordytan (se punkterna 22–24). Valet av metod beror på syftet med provet. I allmänhet rekommenderas att testkemikalien blandas ner i jorden. Appliceringsmetoder som är förenliga med normal lantbrukspraxis kan dock krävas (t.ex. besprutning med flytande beredning eller användning av särskilda beredningar av bekämpningsmedel såsom granulat eller betningsmedel). Lösningsmedel som används till att underlätta behandlingen av jorden med testkemikalien bör väljas på grundval av deras låga toxicitet för daggmaskar, och en lämplig lösningsmedelskontroll ska tas med i testupplägget (se punkt 27).

Nedblandning av testkemikalien i jorden

Testkemikalier som är lösliga i vatten

19. En lösning av testkemikalien i avjonat vatten bereds omedelbart före testets inledning i tillräcklig mängd för att räcka till alla replikat av en testkoncentration. Det kan vara nödvändigt att använda ett hjälplösningsmedel för att underlätta beredningen av testlösningen. Det är lämpligt att bereda den mängd lösning som krävs för att nå den slutliga vattenhalten (40–60 % av maximal vattenhållningskapacitet). Lösningen blandas grundligt med jordsubstratet innan detta placeras i en testbehållare.

Testkemikalier som är olösliga i vatten

20. Testkemikalien upplöses i en liten volym lämpligt organiskt lösningsmedel (t.ex. aceton), och därefter sprejas den på, eller blandas ner i, en liten mängd fin kvartssand. Lösningsmedlet avlägsnas därefter genom avdunstning i ett dragskåp under minst ett par minuter. Den behandlade sanden blandas därefter grundligt med den förhandsfuktade syntetiska jorden. Därefter tillsätts avjonat vatten (i den mängd som krävs) för att uppnå en slutlig fukthalt på 40–60 % av maximal vattenhållningskapacitet och blandas ner. Jorden är nu redo att placeras i testbehållare. Det är viktigt att tänka på att vissa lösningsmedel kan vara toxiska för daggmaskar.

▼M6

Testkemikalier som är olösliga i vatten och organiska lösningsmedel

21. En blandning bestående av 10 g finmald industriell kvartssand med den mängd av testkemikalien som krävs för att uppnå testkoncentrationen i jorden bereds. Blandningen ska sedan blandas grundligt med den förhandsfuktade syntetiska jorden. Avjonat vatten tillsätts sedan i den mängd som krävs för att man ska erhålla den slutliga fukthalten på 40–60 % av maximal vattenhållningskapacitet och blandas ner. Jorden är nu redo att placeras i testbehållare.

Applicering av testkemikalien på jordytan

22. Jorden behandlas efter det att maskarna har tillsatts. Testbehållarna fylls först med det fuktiga jordsubstratet och de vägda daggmaskarna placeras på ytan. Friska maskar gräver sig normalt omedelbart ner i substratet, varför de som fortfarande befinner sig på ytan efter 15 minuter definieras som skadade och måste bytas ut. Om maskarna byts ut bör de nya och de utbytta maskarna vägas, så att den totala levande vikten av den grupp maskar som ska exponeras och den totala vikten av behållaren med maskar vid testets början är kända.

23. Testkemikalien appliceras sedan. Man bör vänta minst en halvtimme efter det att maskarna införts (och inte applicera kemikalien om maskar befinner sig på jordytan), så att man undviker direktexponering för testkemikalien genom hudkontakt. När testkemikalien är ett bekämpningsmedel kan det vara lämpligt att applicera den på jordytan genom besprutning. Testkemikalien ska appliceras på jordytan så jämnt som möjligt med hjälp av en lämplig besprutningsanordning i laboratorieskala för att simulera besprutning på fältet. Före appliceringen bör testbehållarens lock avlägsnas och ersättas med en skyddsfilm som skyddar behållarens sidoväggar från stänk. Skyddsfilmen kan tillverkas av en testbehållare med basen borttagen. Appliceringen bör ske vid en temperatur på 20 ± 2 °C och för vattenlösningar, emulsioner eller dispersioner med en vattenappliceringshastighet på 600–800μl/m^2. Hastigheten bör kontrolleras med hjälp av lämplig kalibreringsteknik. Särskilda beredningar som granulat eller betningsmedel bör appliceras på ett sätt som är förenligt med lantbrukspraxis.

24. Testbehållarna bör få stå utan lock i 1 timme, så att alla flyktiga lösningsmedel som använts i samband med appliceringen av testkemikalien avdunstar. Se till att inga maskar tar sig ut ur testkärlen under denna tid.

FÖRFARANDE

Testgrupper och kontroller

25. En djurtäthet på tio daggmaskar i 500–600 g torrvikt syntetisk jord (dvs. 50–60 g jord per mask) rekommenderas. Om större mängder jord används, vilket kan vara fallet om man testar bekämpningsmedel med särskilda appliceringsmetoder såsom betningsmedel, bör en djurtäthet motsvarande 50–60 g jord per mask bibehållas genom att man ökar antalet maskar. Tio maskar förbereds för varje kontroll- och testbehållare. Maskarna tvättas med vatten och torkas av och placeras sedan på absorberande papper under en kort tid för att överskottsvattnet ska rinna av.

26. För att undvika systematiska fel i fördelningen av maskarna i testbehållarna bör testpopulationens homogenitet bestämmas genom individuell vägning av 20 slumpmässigt utvalda maskar ur den population från vilken testmaskarna ska tas. Efter att ha säkerställt homogeniteten väljs partier av maskar sedan

▼M6

ut, vägs och tilldelas testbehållare genom ett randomiseringsförfarande. Efter det att testmaskarna tillsatts vägs varje testbehållare för att man ska fastställa en initialvikt som kan användas som grund för kontroll av jordens fukthalt under hela testet på det sätt som beskrivs i punkt 30. Testbehållarna täcks enligt beskrivning i punkt 9 och placeras i testkammaren.

27. Lämpliga kontroller bereds för var och en av de appliceringsmetoder för testkemikalien som beskrivs i punkterna 18–24. De relevanta förfarandena för beredning av kontrollerna följs förutom att testkemikalien inte läggs till. I förekommande fall tillsätts organiska lösningsmedel, kvartssand eller andra vehiklar i kontrollerna i de koncentrationer eller mängder som motsvarar dem som används i testkärlen. Om ett lösningsmedel eller annan vehikel används för tillsats av testkemikalien bör en ytterligare kontroll utan vehikeln eller testkemikalien också beredas och testas för att säkerställa att vehikeln inte påverkar resultatet.

Testbetingelser

28. Testtemperaturen ska vara 20 ± 2 °C. Testet utförs under kontrollerade ljus-/mörkercykler (helst 16 h ljus/8 h mörker) med en belysning på 400–800 lux i området med testkärlen.

29. Testbehållarna luftas inte under testet men utformningen av testkärlens lock bör möjliggöra gasutbyte samtidigt som de begränsar avdunstningen av vatten (se punkt 9).

30. Vattenhalten i jordsubstratet i testbehållarna bibehålls under hela testet genom regelbunden omvägning av testbehållarna (minus deras lock). Förluster fylls på vid behov med avjonat vatten. Vattenhalten får inte variera med mer än 10 % jämfört med vattenhalten vid testets början.

Utfodring

31. Allt foder som har en kvalitet som visats vara lämplig för att maskarna åtminstone ska hålla vikten under provet anses godtagbart. Erfarenheten har visat att havremjöl, ko- eller hästgödsel är lämpligt foder. Kontroller ska göras för att se till att de nötkreatur eller hästar från vilka gödseln kommer inte genomgår medicinering eller behandling med kemikalier, t.ex. tillväxtbefrämjande medel, nematicider eller liknande veterinärmedicinska produkter, som kan påverka maskarna under testet. Det rekommenderas att man själv samlar in kogödseln, eftersom erfarenheten har visat att kommersiellt tillgänglig kogödsel som används som trädgårdsgödsel kan påverka maskarna negativt. Gödseln ska lufttorkas, finmalas och pastöriseras före användning.

32. Innan den används i ett test bör varje ny fodersats ges till en maskkultur som inte testas för att säkerställa att den är av lämplig kvalitet. Tillväxten och kokongproduktionen bör inte minska jämfört med maskar hålls i ett substrat som inte innehåller den nya fodersatsen (samma betingelser som de som beskrivs i testmetod C.8 (4)).

33. Första fodergivan ges en dag efter det att maskarna har införts och testkemikalien har tillsatts jorden. Ca 5 g foder sprids ut på jordytan i varje behållare och fuktas med avjonat vatten (ca 5 till 6 ml per behållare). Foder ges därefter en gång i veckan under testperioden på fyra veckor. Om fodret

▼M6

förblir oätet bör mängden minskas för att undvika svampangrepp eller mögel. Adulterna avlägsnas från jorden på testdag 28. Ytterligare 5 g foder ska därefter ges i varje behållare. Ingen ytterligare utfodring sker under de återstående fyra veckorna av testet.

Val av testkoncentrationer

34. Tidigare kunskap om testämnets toxicitet är till hjälp vid valet av lämpliga testkoncentrationer, t.ex. från ett akut test (4) och/eller preliminära test. Vid behov utförs ett preliminärt test med t.ex. fem testkoncentrationer på 0,1, 1,0, 10, 100 och 1 000 mg/kg (torrvikt jord). Ett replikat för varje exponering och kontroll är tillräckligt. Varaktigheten av det preliminära testet är två veckor och dödligheten bedöms i slutet av testet.

Testets utformning

35. Eftersom det inte går att fastställa en enda sammanfattande statistik för detta prov tillhandahåller testmetoden möjligheter att bestämma NOEC och EC_x. Ett NOEC-värde kommer sannolikt att krävas av tillsynsmyndigheterna inom en överskådlig framtid. På grund av statistiska och ekologiska överväganden kan EC_x komma att få en mer omfattande användning inom en nära framtid. Därför föreslås tre utformningar på grundval av rekommendationerna från ett ringtest av ett reproduktionstest för småringmaskar (17).

36. Vid valet av koncentrationsintervall bör man beakta följande:

— För bestämning av NOEC bör man testa minst fem/tolv koncentrationer i en geometrisk serie. Det rekommenderas att man använder fyra replikat för varje testkoncentration plus åtta kontroller. Koncentrationerna bör skilja sig åt med en faktor på högst 2,0.

— För bestämning av ECx (t.ex. EC10, EC50) rekommenderas ett tillräckligt antal koncentrationer för att framkalla minst fyra olika statistiskt signifikanta genomsnittliga responser vid dessa koncentrationer. Det rekommenderas att man använder minst två replikat för varje testkoncentration och sex kontrollreplikat. Koncentrationernas inbördes avståndsfaktor kan variera, dvs. den kan vara mindre än eller lika med 1,8 i det förväntade effektintervallet och större än 1,8 vid högre och lägre koncentrationer.

— Ett kombinerat tillvägagångssätt möjliggör bestämning av både ECx och NOEC. Man bör använda åtta testkoncentrationer i en geometrisk serie. Fyra replikat per exponering plus åtta kontroller rekommenderas. Koncentrationerna bör skilja sig åt med en faktor på högst 1,8.

Testets varaktighet och mätningar

37. Dag 28 iakttas och räknas de levande adulta maskarna. Alla förändringar i adulternas beteende (t.ex. oförmåga att gräva ner sig i jorden, maskar ligger orörliga mot testkärlets glasvägg) och morfologi (t.ex. öppna sår) registreras också. Alla adulter avlägsnas sedan från testkärlen samt räknas och vägs. Om jorden med maskarna överförs till en ren bricka före bedömningen kan adulterna bli lättare att hitta. Maskar som tagits upp ur jorden rengörs (med avjonat vatten) före vägning, och överflödigt vatten avlägsnas genom att maskarna under en kort stund placeras på filterpapper. Alla maskar som inte hittas vid denna tidpunkt ska registreras som döda, eftersom det kan antas att dessa maskar dött och brutits ned före bedömningen.

▼M6

38. Om jorden har avlägsnats från behållaren ska den sedan läggas tillbaka (utan de adulta maskarna men med de kokonger som har producerats). Därefter inkuberas jorden i ytterligare fyra veckor under samma testförhållanden, förutom att utfodring sker endast en gång i början av denna fas av testet (se punkt 33).

39. Vid utgången av den andra fyraveckorsperioden ska antalet juveniler som kläcks ur kokongerna i testjorden och antalet kokonger fastställas enligt de förfaranden som beskrivs i tillägg 5. Alla tecken på skador på maskarna bör också registreras under hela testperioden.

Toleranstest

40. Om inga effekter observeras vid den högsta koncentrationen i det preliminära testet (dvs. 1 000 mg/kg), utförs reproduktionstestet som ett toleranstest med en testkoncentration på 1 000 mg/kg. Ett toleranstest gör det möjligt att visa att NOEC-värdet för reproduktion är större än gränskoncentrationen, samtidigt som man minimerar antalet maskar som används i testet. Åtta replikat bör användas både för den behandlade jorden och för kontrollen.

DATA OCH RAPPORTERING

Behandling av resultaten

41. Även om en översikt ges i tillägg 6, tillhandahålls ingen definitiv statistisk vägledning för analys av testresultaten i denna testmetod.

42. En endpoint är dödlighet. Förändringar i adulternas beteende (t.ex. oförmåga att gräva ner sig i jorden, maskar ligger orörliga mot testkärlets glasvägg) och morfologi (t.ex. öppna sår) bör dock också registreras, liksom eventuell förekomst av juveniler. Probitanalys (18) eller logistisk regressionsanalys bör normalt tillämpas för bestämning av LC_{50}. I de fall då denna analysmetod är olämplig (t.ex. om färre än tre koncentrationer med partiell dödlighet finns tillgängliga) kan alternativa metoder dock användas. Dessa metoder kan omfatta glidande medelvärden (19), den modifierade Spearman-Karbermetoden (20) eller enkel interpolering (t.ex. det geometriska medelvärdet av LC_0 och LC_{100}, som beräknats genom att kvadratroten av LC_0 multiplicerats med LC_{100}).

43. Den andra endpointen är fekunditet (dvs. antalet avkommor som producerats). Liksom i det preliminära testet bör alla andra skadliga tecken registreras i slutrapporten. Den statistiska analysen kräver att man beräknar det aritmetiska medelvärdet $\bar{x}$ och standardavvikelsen per testkärl och per kontroll för reproduktionen.

44. Om en variansanalys har utförts kan standardavvikelsen, s, och frihetsgraderna, df, ersättas av den sammanlagda uppskattningen av variansen som erhållits från variansanalysen (ANOVA) respektive dess frihetsgrader – förutsatt att variansen inte är beroende av koncentrationen. I detta fall ska de enskilda varianserna i kontroll- och testenheter användas. Dessa värden beräknas normalt med hjälp av kommersiell programvara för statistik med användning av resultaten per kärl som replikat. Om det förefaller vara rimligt att slå ihop data för negativa kontroller och kontroller med lösningsmedel snarare än att testa mot en av dem bör de testas för att säkerställa att det inte finns betydande skillnader mellan dem (för lämpligt test, se punkt 47 och tillägg 6).

45. Ytterligare statistisk testning och slutsatser beror på om värdena för replikaten är normalt fördelade och enhetliga med avseende på variansen.

▼M6

Uppskattning av NOEC

46. Man bör främst använda kraftfulla tester. Man bör använda information t.ex. från tidigare erfarenheter med ringtester eller andra tidigare uppgifter om huruvida data är ungefär normalt fördelade. Variansens homogenitet (homoskedasticitet) är av mer avgörande betydelse. Erfarenheter visar att variansen ofta ökar med ett ökande medelvärde. I dessa fall kan en datatransformation leda till homoskedasticitet. En sådan transformation bör baseras på erfarenheterna från tidigare uppgifter i stället för på uppgifter som håller på att undersökas. Med homogena data bör flera t-tester, såsom Williams test (α = 0,05, asymmetriskt) (21) (22) eller i vissa fall Dunnetts test (23) (24), utföras. När det gäller ojämn förökning bör det noteras att t-värdena i tabellen måste korrigeras i enlighet med Dunnett och Williams. Ibland ökar/minskar reaktionerna inte regelbundet på grund av stor variation. I ett sådant fall med kraftig avvikelse från monotonicitet är Dunnetts test lämpligare. Om det finns avvikelser från homoskedasticiteten kan det vara rimligt att närmare undersöka de möjliga effekterna på variansen för att besluta om t-testerna kan tillämpas utan att förlora mycket av sin effekt (25). Alternativt kan ett multipelt U-test tillämpas, t.ex. Bonferronis U-test enligt Holm (26), eller, när dessa data uppvisar heteroskedasticitet men i övrigt är förenliga med en bakomliggande monoton dos-respons, ett annat icke-parametriskt test (t.ex. Jonckheere-Terpstra (27) (28) eller Shirley (29) (30)), och är i allmänhet att föredra framför t-tester med ojämn varians (se även diagrammet i tillägg 6).

47. Om ett toleranstest har utförts och de nödvändiga förutsättningarna för parametriska testförfaranden (normalitet, homogenitet) är uppfyllda, kan ett parvist Students t-test användas eller i annat fall Mann och Whitneys U-testförfarande (31).

Bestämning av EC_x

48. När man beräknar EC_x-värden används medelvärdena per testkärl för regressionsanalys (linjär eller icke-linjär) efter att en lämplig dos-responsfunktion har erhållits. När det gäller maskarnas tillväxt som en kontinuerlig respons kan EC_x-värdena uppskattas med hjälp av en lämplig regressionsanalys (32). Bland lämpliga funktioner för dikotoma data (mortalitet/överlevnad) och antal avkommor återfinns de normala sigmoida eller logistiska funktionerna eller Weibull-funktionen med två till fyra parametrar, varav vissa även kan uttrycka hormetiska responser. Om en dos-respons-funktion anpassas genom linjär regressionsanalys bör en signifikant determinationskoefficient (r^2) och/eller lutning konstateras med regressionsanalysen innan EC_x uppskattas genom att ett värde som motsvarar x % av genomsnittet för kontrollen infogas i den ekvation som utgör resultatet av regressionsanalysen. De 95-procentiga konfidensgränserna beräknas enligt Fieller (hänvisning i Finney (18)) eller andra lämpliga moderna metoder.

49. Alternativt kan responsen uttryckas som en procentandel eller en andel av den modellparameter som tolkas som den genomsnittliga responsen för kontrollen. I dessa fall kan den normala (logistiska, Weibullska) sigmoida kurvan ofta lätt anpassas till resultaten med hjälp av probitregressionsförfarandet (18). I dessa fall måste viktningsfunktionen justeras för metriska responser i enlighet med Christensen (33). Om hormesis har iakttagits bör probitanalysen dock ersättas med en logistisk funktion eller en Weibullfunktion, i båda fallen med fyra parametrar, anpassad genom ett icke-linjärt regressionsförfarande (34). Om en lämplig dos-responsfunktion inte kan anpassas till data kan man använda alternativa metoder för att uppskatta EC_x och dess konfidensgränser, t.ex. glidande medelvärden efter Thompson (19) och det modifierade Spearman-Karberförfarandet (20).

TESTRAPPORT

50. Testrapporten ska innehålla följande uppgifter:

▼M6

Testkemikalie:

— en definitiv beskrivning av testkemikalien, sändnings- och partinummer, CAS-nummer, renhet,

— testkemikaliens egenskaper (t.ex. log Kow, vattenlöslighet, ångtryck, Henrys konstant (H) och information om omvandling, spridning och fördelning).

Testorganismer:

— de använda försöksdjuren: art, vetenskapligt namn, källa och uppfödningsbetingelser,

— testorganismernas ålder, storleksintervall (vikt).

Testbetingelser

— detaljer om förberedelse av testjorden,

— jordens maximala vattenhållningskapacitet,

— en beskrivning av den teknik som används för att applicera testkemikalien på jorden,

— uppgifter om hjälpkemikalier som används för tillförsel av testkemikalien,

— detaljer om kalibreringen av besprutningsutrustningen i förekommande fall,

— beskrivning av testets utformning och testförfarandet,

— testbehållarnas storlek och testjordens volym,

— testbetingelser: ljusintensitet, ljus/mörker-cyklernas varaktighet, temperatur,

— en beskrivning av utfodringsprogrammet, typen och mängden av det foder som används i testet, datum för utfodringar,

— jordens pH-värde och vattenhalt vid början och slutet av testet.

Testresultat:

— dödligheten hos adulter (%) i varje testbehållare vid utgången av de första fyra veckorna,

— den totala vikten av alla adulter i början av testet i varje testbehållare,

— förändringar i kroppsvikt hos levande adulter (% av ursprunglig vikt) i varje testbehållare efter de första fyra veckorna,

— antalet avkommor som producerats i varje testbehållare vid testets slut,

— en beskrivning av olika uppenbara eller patologiska symtom eller tydliga beteendeförändringar,

— de resultat som erhållits med referenstestkemikalien,

— LC_{50}, NOEC eller EC_x (t.ex. EC_{50}, EC_{10}) för reproduktionen om vissa av dem är tillämpliga med konfidensintervaller, och en kurva som representerar den anpassade modell som har använts för beräkningen, samt alla uppgifter och observationer som kan vara till nytta vid tolkningen av resultaten,

— ett diagram över förhållandet mellan dos och respons,

— resultaten för varje testbehållare.

Avvikelser från de förfaranden som beskrivs i denna testmetod och ovanliga händelser under testets gång.

LITTERATUR

(1) Jaenicke, J. (1982). '*Eisenia foetida*' is two biological species. Megadrilogica 4, 6–8.

(2) Oien, N. och 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) Kula, C. (1996). Development of a test method on sublethal effects of pesticides on the earthworm species *Eisenia fetida/Eisenia andrei* – comparison of two ringtests. I: Riepert, F. och Kula, C. (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 denna bilaga: Toxicitet för daggmaskar.

(5) ISO (Internationella standardiseringsorganisationen) (1999). Markundersökningar – Föroreningars effekt på daggmaskar (*Eisenia fetida*). Del 2: Bestämning av effekter på reproduktion, nr 11268-2. ISO, Genève.

(6) ISO (Internationella standardiseringsorganisationen) (1999). Markundersökningar – Föroreningars effekt på daggmaskar (*Eisenia fetida*). Del 1: Bestämning av akut toxicitet med artificiell jord, nr 11268-1. ISO, Genève.

(7) SETAC (1998). Advances in Earthworm Ecotoxicology. Sheppard, S. C., Bembridge, J. D. Holmstrup, M., och L. Posthuma, (red.). SETAC Press, 456 s.

(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) Bouché, M. B. (1972). Lombriciens de France, Ecologie et systématique. Publication de l'Institut National de la Recherche Agronomique.

(10) Edwards, C. A. (1983). Development of a standardized laboratory method for assessing the toxicity of chemical substances to earthworms. Rapport EUR 8714 EN, Europeiska gemenskapernas kommission.

(11) Greig-Smith, P. W., H. Becker, P. J. Edwards och F. Heimbach (red.) (1992). Ecotoxicology of Earthworms. Intercept.

(12) Edwards, C. A. och Bohlen P. J. (1996). Biology and ecology of earthworms, tredje upplagan. Chapman and Hall, London.

(13) ISO (Internationella standardiseringsorganisationen) (1994). Markundersökningar – Bestämning av pH, nr 10390. ISO, Genève.

(14) Hund-Rinke, K, Römbke, J., Riepert, F. och Achazi R. (2000). Beurteilung der Lebensraumfunktion von Böden mit Hilfe von Regenwurmtests. I: Toxikologische Beurteilung von Böden. Heiden, S., Erb, R., Dott, W. och Eisentraeger, A. (red.). Spektrum Verl., Heidelberg. 59–81.

(15) ISO (Internationella standardiseringsorganisationen) (1999). Markundersökningar – Bestämning av den vattenhållande förmågan – Laboratoriemetoder, nr 11274. ISO, Genève.

(16) ISO (Internationella standardiseringsorganisationen) (1995). Markundersökningar – Bestämning av torrsubstans och vattenkvot – Gravimetrisk metod, nr 11465. ISO, Genève.

(17) Römbke J. och Th. Moser (1999). Organisation and Performance of an International Ringtest for the validation of the Enchytraeid Reproduction Test. UBA-Texte 4/99, s. 150 + 223.

▼M6

(18) Finney D. J. (1971). Probit Analysis (tredje upplagan), s. 19–76. Cambridge Univ. Press.

(19) Finney D. J. (1978). Statistical Method in Biological Assay. Charles Griffin & Company Ltd, London.

(20) Hamilton, M. A., R. C. Russo och R. V. Thurston. (1977). Trimmed Spearman-Karber Method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. Environ. Sci. Technol. 11:7, 714–719; korrigering i Environ. Sci. Technol. 12 (1998), 417.

(21) 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.

(22) Williams, D. A., (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics, 28, 519–531.

(23) Dunnett, C. W., (1955). A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. Amer. Statist. Ass. J. 50, 1096–1121.

(24) Dunnett, C. W., (1964) New Tables for Multiple Comparisons with a Control. Biometrics, 20, 482–491.

(25) Hoeven, N. van der, (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) Holm, S. (1979): A simple sequentially rejective multiple test procedure. Scand. J. Statist. 6, 65–70.

(27) Jonckheere, A. R. (1954). A Distribution-free k-Sample Test Against Ordered Alternatives, Biometrika 41, 133–145.

(28) Terpstra, T. J. (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) Shirley, E. A. (1979). The comparison of treatment to control group means in toxicology studies, Applied Statistics 28, 144–151.

(30) Williams, D. A. (1986). A Note on Shirley's Nonparametric Test for Comparing Several Dose Levels with a Zero-Dose Control, Biometrics 42, 183–186.

(31) Sokal, R. R. och F. J. Rohlf. (1981). Biometry. The Principle and practice of statistics in biological research. Andra upplagan. W. H. Freeman and Company. New York.

(32) Bruce R. D. och Versteeg D. J. (1992) A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Environmental Toxicology and Chemistry 11, 1485–1494.

(33) Christensen, E.R. (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. Water Research 18, 213–221.

(34) Van Ewijk, P. H. och J. A. Hoekstra. (1994). Calculation of the EC50 and its confidence interval when sub-toxic stimulus is present. Ecotox, Environ. Safety. 25, 25–32.

▼M6

Tillägg 1

Definitioner

Följande definitioner gäller för denna testmetod:

Kemikalie: ett ämne eller en blandning.

EC_x (koncentration som orsakar x % effekt): den koncentration som orsakar en x-procentig effekt på testorganismerna efter en given exponeringstid jämfört med ett kontrollprov. EC_{50} är till exempel den koncentration som beräknas ha en effekt för en av testets endpoints på 50 % av en exponerad population under en fastställd exponeringstid. I detta test uttrycks effektkoncentrationerna som testkemikaliens vikt per torrvikt testjord eller som testkemikaliens vikt per ytenhet av jorden.

LC_0 (letal koncentration 0 %): den koncentration av testkemikalien som inte orsakar någon av de exponerade testorganismernas död under en given tidsperiod. I detta test uttrycks LC_0-värdet som testkemikaliens vikt per torrvikt testjord.

LC_{50} (letal koncentration 50 %): den koncentration av testkemikalien som orsakar 50 % av de exponerade testorganismernas död under en given tidsperiod. I detta test uttrycks LC_{50}-värdet som testkemikaliens vikt per torrvikt testjord eller som testkemikaliens vikt per ytenhet av jorden.

LC_{100} (letal koncentration 100 %): den koncentration av testkemikalien som orsakar alla de exponerade testorganismernas död under en given tidsperiod. I detta test uttrycks LC_{100}-värdet som testkemikaliens vikt per torrvikt testjord.

Lägsta koncentration med observerad effekt (LOEC): den lägsta koncentrationen testkemikalien som har en statistiskt signifikant effekt ($p < 0,05$). I detta test uttrycks LOEC som testkemikaliens vikt per torrvikt testjord eller som testkemikaliens vikt per ytenhet av marken. Alla testkoncentrationer som överstiger LOEC bör normalt uppvisa en effekt som statistiskt skiljer sig från kontrollen. Eventuella avvikelser från ovan måste motiveras i testrapporten.

Nolleffektkoncentrationen (NOEC): den högsta koncentrationen av testkemikalien omedelbart under LOEC-värdet vid vilken ingen effekt observeras. I detta test har en halt som motsvarar NOEC ingen statistiskt signifikant effekt ($p < 0,05$) efter en given exponeringstid jämfört med ett kontrollprov.

Reproduktionstakt: det genomsnittliga antalet avkommor som producerats per ett antal adulta maskar under testperioden.

Testkemikalie: alla ämnen eller blandningar som testas med denna testmetod.

▼M6

Tillägg 2

Fastställande av jordens maximala vattenhållningskapacitet

Följande metod för att bestämma jordens maximala vattenhållningskapacitet har visat sig vara lämplig. Den beskrivs i bilaga C till ISO DIS 11268-2 (1).

Samla in en fastställd kvantitet (t.ex. 5 g) testjordsubstrat med hjälp av en lämplig anordning (jordborr med rör osv.). Täck botten av röret med en bit filterpapper och fyll det med vatten. Placera det därefter på en ställning i ett vattenbad. Röret bör gradvis nedsänkas i vattnet tills vattenytan är ovanför jordytan. Det bör därefter lämnas i vattnet i cirka 3 timmar. Eftersom allt vatten som absorberas av jordens kapillärer inte kan hållas kvar bör jordprovet dräneras i 2 timmar genom att röret placeras på en bädd av mycket fuktig finmald kvartssand i ett slutet kärl (för att förhindra uttorkning). Provet bör sedan torkas till en konstant vikt vid 105 °C och vägas. Vattenhållningskapaciteten (WHC) ska beräknas enligt följande:

$$\text{WHC (i \% av torrvikten)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

där

S = vattenmättat substrat + rörets vikt + filterpapprets vikt

T = emballagevikt (rörets vikt + filterpapprets vikt)

D = substratets torrvikt

HÄNVISNINGAR:

(1) ISO (Internationella standardiseringsorganisationen) (1999). Markundersökningar – Föroreningars effekt på daggmaskar (*Eisenia fetida*). Del 2: Bestämning av effekter på reproduktion, nr 11268-2. ISO, Genève.

▼M6

Tillägg 3

Bestämning av jordens pH-värde

Följande metod för bestämning av pH-värdet i jord bygger på beskrivningen i ISO DIS 10390: Markundersökningar – Bestämning av pH (1).

En bestämd mängd jord torkas i rumstemperatur i minst 12 timmar. En suspension av jorden (som innehåller minst 5 gram jord) bereds därefter i fem gånger dess volym med antingen 1 M kaliumkloridlösning (KCl) av analyskvalitet eller 0,01 M kalciumkloridlösning ($CaCl_2$) av analyskvalitet. Suspensionen skakas därefter omsorgsfullt i fem minuter och får sedan stå och klarna i minst 2 timmar men högst 24 timmar. Vätskefasens pH mäts sedan med en pH-mätare som har kalibrerats före varje mätning med hjälp av ett antal lämpliga buffertlösningar (t.ex. pH 4,0 och 7,0).

HÄNVISNINGAR:

(1) ISO (Internationella standardiseringsorganisationen) (1994). Markundersökningar – Bestämning av pH, nr 10390. ISO, Genève.

▼M6

Tillägg 4

Odling av *Eisenia fetida* och *Eisenia andrei*

Maskarna bör helst födas upp i en klimatkammare vid en temperatur på 20 ± 2 °C. Vid denna temperatur och med tillräckligt mycket foder blir maskarna könsmogna vid 2–3 månaders ålder.

Båda arterna kan odlas i ett stort antal olika typer av animaliskt avfall. Som odlingsmedium rekommenderas en 50/50-blandning av häst- eller boskapsgödsel och torv. Kontroller ska göras för att se till att de nötkreatur eller hästar från vilka gödseln kommer inte genomgår medicinering eller behandling med kemikalier, t.ex. tillväxtbefrämjande medel, nematicider eller liknande veterinärmedicinska produkter, som kan påverka maskarna under testet. Det rekommenderas att man själv samlar in gödseln, eftersom erfarenheten har visat att kommersiellt tillgänglig gödsel som används som trädgårdsgödsel kan påverka maskarna negativt. Mediet bör ha ett pH på cirka 6–7 (reglerat med kalciumkarbonat), låg jonisk konduktivitet (lägre än 6 mS/cm eller en salthalt på under 0,5 %), och bör inte ha för hög halt av ammoniak eller animaliskt urin. Substratet bör vara fuktigt men inte för vått. Odlingslådor med en storlek på 10–50 liter är lämpliga.

För att få maskar med standardålder och storlek (vikt), är det bäst att inleda odlingen med kokonger. När kulturen har etablerats underhålls den genom att man placerar adulta daggmaskar i en avelslåda med färskt substrat i mellan 14 och 28 dagar för att möjliggöra produktion av ytterligare kokonger. Adulterna avlägsnas sedan, och de juveniler som produceras ur kokongerna används som utgångsmaterial för nästa kultur. Maskarna utfodras kontinuerligt med animaliskt avfall och överförs då och då till ett färskt substrat. Erfarenheten har visat att lufttorkad finmald ko- eller hästgödsel eller havremjöl är ett lämpligt foder. Det bör säkerställas att de nötkreatur eller hästar från vilka gödseln kommer inte genomgår medicinering eller behandling med kemikalier, såsom tillväxtbefrämjande medel, som kan påverka maskarna under testet. De daggmaskar som kläcks ur kokongerna används för testning när de är mellan 2 och 12 månader gamla och betraktas som adulta.

Maskarna anses vara friska om de rör sig genom substratet, inte försöker lämna substratet och förökar sig kontinuerligt. Om maskarna rör sig mycket långsamt och har en gul bakre del tyder det på att substratet har utarmats. I detta fall rekommenderas tillhandahållande av färskt substrat och/eller minskad djurtäthet.

▼M6

Tillägg 5

Metoder för räkning av juvenila maskar som kläcks ur kokongerna

Det är mycket tidskrävande att sortera maskarna från jordsubstratet för hand. Två alternativa metoder rekommenderas därför:

(a) Testbehållarna placeras i ett vattenbad med en temperatur initialt på 40 °C men som stiger till 60 °C. Efter cirka 20 minuter har de juvenila maskarna i regel tagit sig upp på substratets yta och kan då lätt avlägsnas och räknas.

(b) Testjorden kan tvättas genom en sikt med den metod som utvecklats av van Gestel m.fl. (1) under förutsättning att den torv och stallgödsel eller havremjöl som tillförs jorden har mals ner till ett fint pulver. Två 0,5 mm siktar (diameter 30 cm) placeras ovanpå varandra. Innehållet i en testbehållare tvättas genom siktarna med ett kraftigt flöde av kranvatten, vilket gör att ungmaskarna och kokongerna främst blir kvar på den övre sikten. Det är viktigt att notera att hela den övre siktens yta bör hållas våt under detta moment så att de juvenila maskarna flyter på ett tunt skikt med vatten, vilket därmed hindrar dem från att krypa ner genom siktens maskor. De bästa resultaten uppnås när ett duschmunstycke används.

När allt jordsubstrat har tvättats genom sikten, kan juvenilerna och kokongerna sköljas från den övre sikten ner i en skål. Innehållet i skålen får sedan stå så att tomma kokonger flyter upp till vattenytan och fulla kokonger och ungmaskar sjunker till botten. Vattnet kan sedan hällas bort och ungmaskarna och kokongerna flyttas till en petriskål som innehåller lite vatten. Maskarna kan avlägsnas för att räknas med en nål eller en pincett.

Erfarenheten har visat att metod (a) passar bättre till extraktion av ungmaskar som kan tvättas genom en 0,5 mm sikt.

Effektiviteten av den metod som används för att avlägsna maskarna (och vid behov kokongerna) från jordsubstratet bör alltid fastställas. Om juvenilerna samlas in med hjälp av sortering för hand rekommenderas att man genomför proceduren två gånger på alla prov.

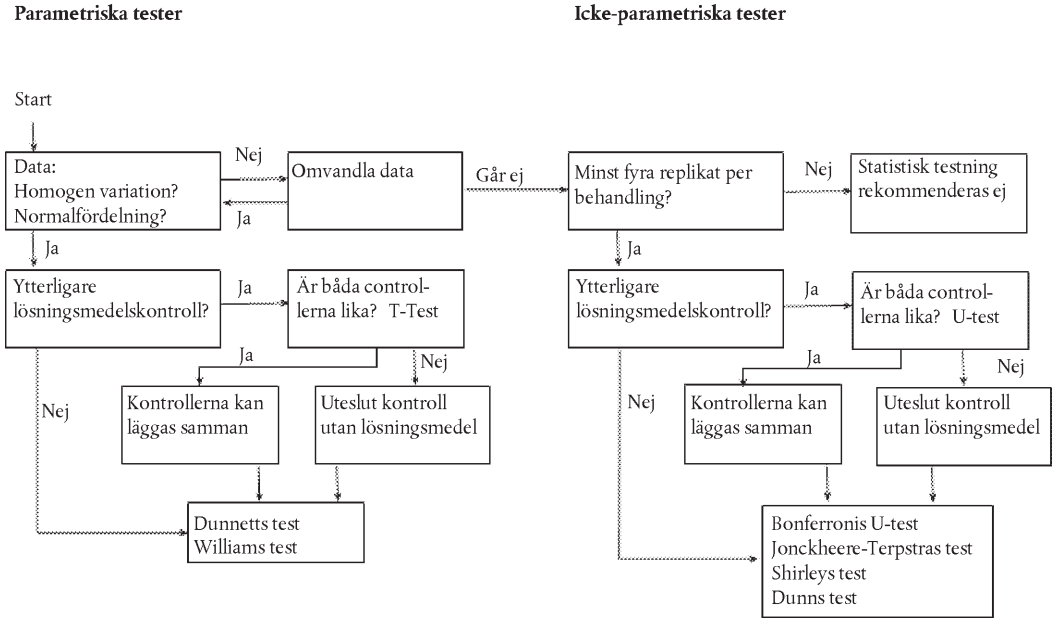
HÄNVISNINGAR:

(1) Van Gestel, C. A. M., W. A. van Dis, E. M. van Breemen, P. M. Sparenburg (1988). Comparison of two methods determining the viability of cocoons produced in earthworm toxicity experiments. Pedobiologia 32, 367–371.

▼M6

Tillägg 6

Översikt över de statistiska dataanalyserna (bestämning av NOEC)



▼M6

C.34 BESTÄMNING AV HÄMNINGEN AV DEN ANAEROBA BAKTERIEAKTIVITETEN – MINSKNINGEN AV GASPRODUKTIONEN FRÅN ANAEROBT SLAM (AVLOPPSVATTEN) SOM GENOMGÅR RÖTNING

INLEDNING

1. Den här testmetoden motsvarar OECD:s testriktlinje (TG) 224 (2007). Kemikalier som släpps ut i vattenmiljön passerar genom både aeroba och anaeroba zoner där de kan brytas ner och/eller hindra bakterieaktiviteten. I vissa fall kan de bli kvar opåverkade i anaeroba zoner i decennier eller längre. Vid behandling av avloppsvatten är det första steget (försedimenteringen) aerobt i supernatanten och anaerobt i det underliggande slammet. Detta följs i det andra steget av en aerob zon i luftningstanken med det aktiva slammet och en anaerob zon i det underliggande slammet i den sekundära sedimenteringstanken. Slam från båda dessa steg genomgår normalt anaerob behandling, då metan och koldioxid produceras som normalt används för att framställa elektricitet. Ute i miljön stannar sannolikt kemikalier som tillförs sediment kvar i bukter, flodmynningar och hav i dessa anaeroba zoner på obestämd tid om de inte är bionedbrytbara. Större mängder av vissa kemikalier kommer framför allt att nå dessa områden på grund av sina fysiska egenskaper, t.ex. låg löslighet i vatten, hög adsorption till uppslammade fasta ämnen samt oförmåga att genomgå aerob bionedbrytning.

2. Även om det är önskvärt att kemikalier som släpps ut i miljön är bionedbrytbara under både aeroba och anaeroba förhållanden är det nödvändigt att dessa kemikalier varken hämmar aktiviteten av mikroorganismer i den ena zonen eller den andra. I Storbritannien har det förekommit några fall av fullständig hämning av metanproduktionen orsakad t.ex. av pentaklorfenol i industriella utsläpp, vilket leder till mycket kostsamma transporter av slam från rötkamrarna till ”säkra” områden och import av friskt rötslam från närliggande anläggningar. Men det finns många fall av mindre allvarliga störningar av rötningen på grund av flera andra kemikalier, inbegripet alifatiska halogenerade kolväten (kemtvätt) och rengöringsmedel, vilket leder till betydande försämring av effektiviteten i rötkamrarna.

3. Endast en testmetod C.11 (1), gäller hämningen av bakteriell aktivitet (respiration i aktiverat slam), och bedömer effekten av testkemikalierna på syreupptagningshastigheten i närvaro av substratet. Metoden har använts i stor utsträckning för att ge tidig varning om kemikaliers eventuella skadeverkningar på den aeroba behandlingen av avloppsvatten, samt för att ge en indikation på de icke-hämmande koncentrationer av testkemikalier som ska användas i olika tester för bionedbrytning. Testmetod C.43 (2) ger en begränsad möjlighet att fastställa en testkemikalies toxicitet för gasproduktionen i anaerobt slam utspätt till en tiondel av sin normala koncentration av fasta ämnen, så att man uppnår den noggrannhet som krävs vid bedömningen av den procentuella bionedbrytningen. Eftersom utspätt slam skulle kunna vara mer känsligt för hämmande kemikalier beslutade ISO-gruppen att utarbeta en metod i vilken man använder outspätt slam. Minst tre texter undersöktes (från Danmark, Tyskland och Storbritannien), och till slut utarbetades två ISO-standarder, en med outspätt slam, ISO 13641-1 (3), och en med slam utspätt till en hundradel, ISO 13641-2 (4), som representerar gyttja och sediment med låga bakteriepopulationer. Båda metoderna genomgick ett ringtest (5). Del 1 bekräftades som en godtagbar standard men det rådde oenighet om del 2. Storbritannien ansåg att metoden behövde utredas ytterligare eftersom en betydande andel av deltagarna rapporterade mycket liten eller ingen gasproduktion, delvis på grund av att procentandelen för gasutrymmet var för hög (75 %) för optimal känslighet.

4. I tidigare arbeten i Storbritannien (6) (7) beskrivs en manometrisk metod där man använder outspätt rötslam, plus obehandlat avloppsslam som substrat, i 500 ml mätkolvar. Utrustningen var dock ohanterlig och stanken från det obearbetade slammet vidrig. Shelton och Tiedjes (8) mer kompakta och

▼M6

praktiska utrustning i den form som utvecklats av Battersby och Wilson (9) användes senare framgångsrikt av Wilson m.fl. (10). Kawahara m.fl. (11) behandlade vanligare typer av slam framgångsrikt i laboratoriet för användning i tester av ett antal kemikalier för anaerob bionedbrytbarhet och hämning. Obehandlat slam som substrat ersattes också för att man skulle kunna genomföra tester antingen med anaerobt slam utspätt till en hundradel eller med gyttja, sediment etc. med låg bakteriell aktivitet.

5. Denna metod kan ge information som är värdefull vid bedömning av den sannolika effekten av en testkemikalie på gasproduktionen i anaeroba rötkammare. Endast längre tester som är bättre på att simulera arbetande rötkammare kan dock ge en indikation huruvida det kan ske en anpassning av mikroorganismerna till testkemikalien eller om koncentrationen av kemikalier som sannolikt absorberas och adsorberas till slammet kan byggas upp till toxiska nivåer under en längre period än vad som medges i detta test.

PRINCIP FÖR TESTMETODEN

6. Alikvoter av en blandning av anaerobt rötslam (20–40 g/l fasta ämnen totalt) och en nedbrytbar substratlösning inkuberas enskilt och tillsammans med en rad koncentrationer av testkemikalien i slutna kärl i upp till tre dagar. Den mängd gas (metan plus koldioxid) som produceras mäts genom det ökade trycket (Pa) i flaskorna. Den procentuella hämningen av gasproduktionen som de olika koncentrationerna av testkemikalien förorsakar beräknas utifrån den gasmängd som produceras i test- respektive kontrollflaskorna. EC_{50} och andra effektiva koncentrationer beräknas utifrån plottar över den procentuella hämningen mot koncentrationen av testkemikalierna eller, mer vanligtvis, dess logaritm.

INFORMATION OM TESTKEMIKALIEN

7. Testkemikalier bör normalt användas i den renaste form som är lätt tillgänglig eftersom orenheter i vissa kemikalier, t.ex. klorfenoler, kan vara mycket mer toxiska än testkemikalien i sig. Man bör dock överväga behovet av att testa kemikalier i den form i vilken de framställs/är kommersiellt tillgängliga. Användningen av sammansatta produkter rekommenderas i regel inte. För svårlösliga testkemikalier kan dock användningen av sammansatt material vara lämpligt. De av testkemikaliens egenskaper som bör finnas tillgängliga omfattar löslighet i vatten och i vissa organiska lösningsmedel, ångtryck, adsorptionskoefficient, hydrolys och bionedbrytbarhet under anaeroba förhållanden.

METODENS TILLÄMPBARHET

8. Testet kan tillämpas på kemikalier som är lösliga eller olösliga i vatten, inklusive flyktiga kemikalier. Särskild försiktighet bör dock iakttagas med material med låg löslighet (se hänvisning (12)) och hög volatilitet. Även inokulat från andra anaeroba anläggningar, t.ex. gyttja, mättade jordar, sediment, får användas. Anaeroba bakteriella system som tidigare har exponerats för giftiga kemikalier kan anpassas till att bibehålla sin aktivitet i närvaro av xenobiotiska kemikalier. Inokulat från anpassade bakteriella system kan visa en högre tolerans för testkemikalien jämfört med inokulat från icke-anpassade system.

REFERENSKEMIKALIER

9. För att kontrollera förfarandet testas en referenskemikalie genom att man inrättar lämpliga kärl parallellt som en del av ett normalt testförfarande. 3,5-diklorfenol har visat sig konsekvent hämma såväl anaerob gasproduktion som syreförbrukningen i aktiverat slam samt andra biokemiska reaktioner. Två andra kemikalier har visat sig vara mer hämmande på metanproduktionen än 3,5-diklorfenol, nämligen metylenbistiocyanat och pentaklorfenol, men resultaten med dessa kemikalier har inte validerats. Pentaklorfenol rekommenderas inte, eftersom det inte finns lätt tillgängligt i ren form.

▼M6

TESTRESULTATENS REPRODUCERBARHET

10. I ett internationellt ringtest (5) fanns det endast god reproducerbarhet för EC_{50}-värden mellan de tio deltagande laboratorierna för 3,5-diklorfenol och 2-bromoetansulfonsyra (intervallet för det förstnämnda var 32–502 mg/l och för det sistnämnda 220–2 190 mg/l).

Antal laboratorier	Som mg/l			Som mg/g slam		
	medelvärde	sd	cv (%)	medelvärde	sd	cv (%)
	3,5-diklorfenol					
10	153	158	103	5	4,6	92
	2-bromoetansulfonsyra					
10	1 058	896	85	34	26	76

EC_{50}-värden från ringtest – outspätt slam

11. De höga variationskoefficienterna mellan laboratorierna återspeglar i stor utsträckning skillnader i känslighet hos slammets mikroorganismer på grund av huruvida de tidigare exponerats eller inte exponerats för testkemikalien eller andra kemiskt besläktade kemikalier. Den noggrannhet med vilken man fastställde EC_{50}-värdet grundat på koncentrationen i slammet var knappast bättre än det ”volymetriska” värdet (mg/l). De tre laboratorier som rapporterat noggrannheten för sina EC_{50}-värden för 3,5-diklorfenol visade på mycket lägre variationskoefficienter (22,9 respektive 18 % för EC_{50} mg/g) än variationskoefficienterna för medelvärdet för alla tio laboratorier. De enskilda medelvärdena för dessa tre laboratorier var 3,1, 3,2 respektive 2,8 mg/g. De lägre, godtagbara variationskoefficienterna inom laboratorierna jämfört med de mycket högre koefficienter mellan laboratorierna, det vill säga 9–22 % jämfört med 92 %, visar att det finns stora skillnader i egenskaperna hos de enskilda slammen.

BESKRIVNING AV TESTMETODEN

Utrustning

12. Vanlig laboratorieutrustning samt följande krävs:

a) Inkubator – gnistsäker och validerad vid 35 ± 2 °C.

b) Trycksäkra testkärl av glas av lämplig nominell storlek ([1]), som vart och ett är försett med ett gastätt belagt septum som tål cirka 2 bar eller 2×10^5 Pa (för beläggning använd t.ex. PTFE = polytetrafluoreten). Injektionsflaskor av glas med en nominell volym på 125 ml och en faktisk volym på cirka 160 ml som är förseglade med ampullpackningar ([2]) och aluminiumringar rekommenderas, men flaskor med en total volym på mellan 0,1 och 1 liter kan också användas.

([1]) Rekommenderad storlek är 0,1–1 liter.

([2]) Användningen av gastäta silikonseptum rekommenderas. Vidare rekommenderas att lockens gastäthet, i synnerhet butylgummiseptum, provas eftersom flera kommersiellt tillgängliga septum inte är tillräckligt gastäta mot metan och vissa septum inte förblir täta när de genomborras med en nål under testbetingelserna.
— Gastäta överdragna septum rekommenderas och ska användas för flyktiga kemikalier (vissa kommersiella septum är relativt tunna, mindre än 0,5 cm, och förblir inte gastäta när de genomborras av en kanyl).
— Butylgummiseptum (ca 1 cm) rekommenderas om testämnena inte är flyktiga (dessa förblir normalt gastäta när de genomborras.)
— Före testet rekommenderas att septumen granskas noga med avseende på deras förmåga att förbli gastäta när de genomborras.

▼M6

c) Precisionstryckmätare [1] och nålfäste

Den totala gasproduktionen (metan och koldioxid) mäts med hjälp av en tryckmätare som anpassats till att möjliggöra mätning och uttömning av den producerade gasen. Ett exempel på ett lämpligt instrument är en handhållen precisionstryckmätare som är kopplad till nålen på en injektionsspruta. En gastät trevägsventil underlättar utsläpp av övertryck (tilllägg 1). Den inre volymen hos tryckomvandlarens slang och ventil måste vara så låg som möjligt så att de fel som uppkommer när man underlåter att beakta utrustningens volym är obetydliga.

d) Isolerade behållare för transport av rötslam.

e) Trevägstryckventiler.

f) Sikt med 1 mm kvadratiska maskor.

g) Tank för rötslammet, en flaska av glas eller HD-polyeten med en kapacitet på 5 liter, försedd med en omrörare och utrustning som gör det möjligt för en ström av kvävgas (se punkt 13) att passera genom gasutrymmet.

h) Membranfilter (0,2 μm) för sterilisering av substratet.

i) Mikrosprutor för gastät anslutning av tryckomvandlaren (se punkt 12 c) till flaskornas gasutrymme (se punkt 12 b), och även för att tillsätta olösliga testämnen i vätskeform i flaskorna.

j) Handskbox, valfritt men rekommenderas, med ett litet positivt tryck av kväve.

Reagens

13. Reagens av analyskvalitet bör användas genomgående. Kvävgas med hög renhet och med en syrgashalt på mindre än 5μl/l bör användas genomgående.

Vatten

14. Om utspädning är nödvändig i något steg används avjonat vatten som tidigare avluftats. Det är inte nödvändigt att utföra analytiska kontroller av detta vatten, men se till att avjoniseringsapparaten underhålls regelbundet. Använd avjonat vatten också för beredning av stamlösningar. Innan det anaeroba inokulatet tillsätts någon testämneslösning eller någon utspädning av testämnet, se till att dessa är syrefria. Detta görs antingen genom att man blåser kvävgas genom utspädningsvattnet (eller utspädningarna) i 1 timme före tillsatsen av inokulat, eller genom att man hettar upp utspädningsvattnet till kokpunkten och låter det svalna till rumstemperatur i en syrefri atmosfär.

Rötslam

15. Samla in aktivt rötslam från rötkammaren vid ett reningsverk eller från en laboratorierötkammare som båda behandlar slam som huvudsakligen kommer från avloppsvatten från hushåll. Praktisk information om slam från laboratorierötkammare finns att tillgå i (11). Om man avser att använda ett anpassat inokulat kan man överväga att använda rötslam från ett reningsverk som behandlar industriavloppsvatten. För insamling av slam ska man

[1] Mätinstrumentet bör användas och kalibreras regelbundet enligt tillverkarens anvisningar. Om en tryckmätare av föreskriven kvalitet används, t.ex. inkapslad med ett stålmembran, behövs ingen kalibrering i laboratoriet. Den bör kalibreras av ett auktoriserat institut vid rekommenderade intervaller. Noggrannheten i kalibreringen kan kontrolleras i laboratoriet med en enpunktsmätning vid 1×10^5 Pa mot en tryckmätare med en mekanisk display. När denna punkt mäts korrekt, kommer linjäriteten också att vara oförändrad. Om andra mätinstrument används (utan certifierad kalibrering av tillverkaren), rekommenderas regelbunden omvandling av mätvärdena över hela mätområdet (tillägg 2).

▼M6

använda vidhalsade flaskor tillverkade av högdensitetspolyeten eller liknande material som kan vidga sig. Tillsätt slammet i provflaskorna upp till cirka 1 cm från överkanten och försegla dem så att de blir täta, helst med en försegling med säkerhetsventil (punkt 12 e), och placera dem i isolerade behållare (punkt 12 d) för att minimera temperaturchocker tills de kan flyttas till en inkubator med en temperatur på 35 ± 2 °C. När flaskorna öppnas ska man vara noga med att släppa ut gasövertrycket antingen genom att försiktigt lossa på förseglingen, eller genom en trevägstryckutlösningsventil (punkt 12 e). Det är bäst att använda slammet inom några timmar från insamlingen. I annat fall ska det förvaras vid 35 ± 2 °C under ett gasutrymme med kväve i upp till tre dagar, under vilka aktivitetsförlusten normalt är liten.

Varning! Slam som genomgår rötning producerar lättantändliga gaser som medför brand- och explosionsrisker, och innehåller även potentiellt patogena organismer. Lämpliga försiktighetsåtgärder bör därför vidtas vid hantering av slam. Av säkerhetsskäl ska glasbehållare inte användas för insamling av slam.

Inokulat

16. Omedelbart före användningen blandas slammet genom försiktig omrörning, och passeras sedan genom en sikt med maskstorleken 1 mm (punkt 12 f) ner i en lämplig flaska (punkt 12 g) genom gasutrymmet, genom vilket passerar ett kvävgasflöde. Ta ett prov för mätning av koncentrationen av den totala torrsubstansen (se t.ex. ISO 11923 (13) eller motsvarande EU-standard). I allmänhet används slammet utan utspädning. Koncentrationen av fasta ämnen är normalt mellan 2 % och 4 % (w/v). Kontrollera pH-värdet i slam och justera vid behov till 7 ± 0,5.

Testsubstrat

17. Lös upp 10 g näringslösning (t.ex. Oxoid), 10 g jästextrakt och 10 g D-glukos i avjonat vatten och späd till 100 ml. Sterilisera genom filtrering genom ett 0,2 μm membranfilter (punkt 12 h) och använd omedelbart eller förvara vid 4 °C i högst en dag.

Testkemikalie

18. Bered en separat stamlösning för varje vattenlöslig testkemikalie så att den innehåller t.ex. 10 g/l av kemikalien i syrefritt utspädningsvatten (punkt 14). Använd lämpliga volymer av stamlösningarna till bereda reaktionsblandningar med graderade koncentrationer. Som ett alternativ kan man bereda en spädningsserie av varje stamlösning så att den volym som tillsätts testflaskorna är densamma för varje föreskriven slutlig koncentration. pH-värdet i stamlösningen justeras vid behov till 7 ± 0,2.

19. För testkemikalier som inte är tillräckligt lösliga i vatten ska ISO 10634 (12) eller motsvarande EU-standard konsulteras. Om ett organiskt lösningsmedel måste användas bör lösningsmedel såsom kloroform och koltetraklorid, som är kända för att starkt hämma metanproduktionen, undvikas. Bered en lösning med lämplig koncentration av icke vattenlösliga kemikalier i ett lämpligt flyktigt lösningsmedel, t.ex. aceton eller dietyleter. Häll de erforderliga volymerna av lösningsmedelslösning i de tomma testflaskorna (punkt 12 b) och avdunsta lösningsmedlet innan slammet tillsätts. För andra behandlingar ska ISO 10634 (12) eller motsvarande EU-standard användas, men var medveten om att alla ytaktiva ämnen som används för att framställa emulsioner kan verka hämmande på den anaeroba gasproduktionen. Om förekomsten av organiska lösningsmedel och emulgeringsmedel anses orsaka artefakter, kan testkemikalien tillsättas direkt i testblandningen i pulver- eller vätskeform. Flyktiga kemikalier och icke vattenlösliga flytande testkemikalier kan injiceras i inokulerade injektionsflaskor med mikrosprutor (punkt 12 i).

▼M6

20. Tillsätt testkemikalierna i flaskorna så att en geometrisk serie koncentrationer erhålls, t.ex. 500 mg/l, 250 mg/l, 125 mg/l, 62,5 mg/l, 31,2 mg/l och 15,6 mg/l. Om toxicitetsintervallet inte är känt från liknande kemikalier ska ett preliminärt test först utföras med koncentrationerna 1 000 mg/l, 100 mg/l och 10 mg/l för att fastställa ett lämpligt intervall.

Referenskemikalie

21. Bered en lösning av 3,5-diklorfenol (10 g/l) genom att gradvis tillsätta den minsta möjliga mängden natriumhydroxidlösning (5 mol/l) till det fasta ämnet under omskakning tills det har lösts. Tillsätt sedan syrefritt utspädningsvatten (punkt 14) till den erforderliga volymen. Sonikering kan underlätta upplösningen. Andra referenskemikalier kan användas när det genomsnittliga referensintervallet för EC_{50} har erhållits i minst tre tester med olika inokulat (olika källor eller olika tidpunkter för insamling).

STÖRNINGAR/FEL

22. Vissa beståndsdelar i slammet skulle förmodligen kunna reagera med potentiella hämmare och göra dem otillgängliga för mikroorganismer, vilket skulle ge lägre eller ingen hämning. Om slammet dessutom redan innehåller en kemikalie som är hämmande kommer felaktiga resultat att erhållas när en sådan kemikalie testas. Utöver dessa möjligheter finns det ett antal identifierade faktorer som kan leda till felaktiga resultat. Dessa förtecknas i tillägg 3 jämte metoder för att avskaffa eller åtminstone reducera fel.

TESTFÖRFARANDE

23. Antalet nödvändiga replikat beror på den grad av precision som krävs för hämningsmätningarna. Om flaskornas förseglingar är tillräckligt gastäta under hela testet räcker det att man inrättar endast ett parti (minst tre exemplar) med testflaskor för varje erforderlig koncentration. På samma sätt inrättas ett parti flaskor med referenskemikalien och en uppsättning kontroller. Om flaskornas förseglingar endast är tillförlitliga för en eller ett fåtal nålstick inrättas ett parti (t.ex. tre exemplar) med testflaskor för varje intervall (t) för vilket resultat krävs för alla koncentrationer av testkemikalien som ska testas. På samma sätt inrättas ”t”-partier med flaskor för referenskemikalien och för kontrollerna.

24. Det rekommenderas att man använder en handskbox (punkt 12 j). Minst 30 minuter innan testet påbörjas leds en ström av kväve genom handskboxen som innehåller all nödvändig utrustning. Se till att temperaturen i slammet ligger på 35 ± 2 °C under hanteringen och förseglingen av flaskorna.

Preliminärt test

25. Om aktiviteten i slammet är okänd rekommenderas det att man utför ett preliminärt test. Inrätta kontroller för att få t.ex. koncentrationer av fasta ämnen på 10 g/l, 20 g/l och 40 g/l plus substrat, men använd ingen testkemikalie. Använd dessutom olika volymer reaktionsblandning för att få tre eller fyra förhållanden mellan gasutrymmesvolymen och vätskevolymen. Byggt på resultaten rörande de gasvolymer som produceras vid olika tidsintervaller väljs de mest lämpliga villkor som gör det möjligt att utföra två dagliga mätningar som ger betydande gasmängder och tryckutsläpp per dag vid optimal känslighet ([1]) utan risk för explosioner.

Tillsättning av testkemikalier

26. Häll vattenlösliga testkemikalier i tomma testflaskor (se punkt 12 b) som vattenlösningar (punkt 18). Använd minst tre uppsättningar flaskor för var

([1]) Detta gäller den försöksuppställning och de försöksbetingelser varvid de volymer gas som produceras – i blankprov och i kärl med 70–80 % tillväxthämning – kan uppskattas med en acceptabel felmarginal.

▼M6

och en av koncentrationerna i en serie (punkt 20). När det gäller olösliga och svårlösliga testkemikalier ska lösningar av dessa i organiska lösningsmedel injiceras med hjälp av en mikrospruta i tomma flaskor så att man får replikatuppsättningar av varje serie med fem koncentrationer av testkemikalien. Avdunsta lösningsmedlet genom att låta en stråle av kvävgas passera över ytan på lösningarna i testflaskorna. Ett annat alternativ är att tillsätta olösliga kemikalier i fast form som vägda mängder av det fasta ämnet direkt i testflaskorna.

27. Om flytande testkemikalier som är olösliga eller svårlösliga i vatten inte tillsätts via ett lösningsmedel ska de tillsättas direkt i testflaskorna med hjälp av en mikrospruta efter tillsättning av inokulat och testsubstrat (se punkt 30). Flyktiga testkemikalier kan tillsättas på samma sätt.

Tillsättning av inokulat och substrat

28. Rör ner en lämplig volym av siktat rötslam (se punkt 16) i en flaska på 5 liter (punkt 12 g), medan en ström av kväve passeras genom gasutrymmet. Spola ur testflaskorna, som innehåller vattenlösningar eller evaporerade lösningsmedelslösningar av testkemikalier, med en ström av kvävgas i ungefär två minuter för att avlägsna luft. Fördela alikvoter, t.ex. 100 ml, av väl uppblandat slam i testflaskorna med hjälp av en pipett med bred spets eller en mätcylinder. Det är mycket viktigt att fylla pipetten i ett enda steg till den exakta volymen slam som krävs eftersom det är lätt att de fasta ämnena i slammet sjunker till botten. Om mer tas upp i pipetten än vad som behövs, töm den och börja om på nytt.

29. Därefter tillsätts så mycket substratlösning (punkt 17) som krävs för att få en koncentration på 2 g/l för vart och ett av näringslösningen, jästextraktet och D-glukosen i blandningen, samtidigt som kvävet fortfarande spolas igenom. Följande är ett exempel på ett testparti.

Slutlig masskoncentration av testkemikalien i testflaskorna (mg/l)	Testkemikaliens volym (ml)		Reagens och medier (ml)		
	Stamlösning a) 10 g/l punkt 18	Stamlösning b) 1 g/l punkt 18	Spädnings-vatten punkt 14	Inokulat 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

Flaskans totala volym = 160 ml. Vätskans volym = 103 ml
Gasvolymen = 57 ml eller 35,6 % av den totala volymen.

30. Spola på samma sätt ur tillräckligt tomma testflaskor med kvävgas för att handskas med eventuella flyktiga och olösliga vätskeformiga testkemikalier (se punkt 27).

▼M6

Kontroller och referenskemikalie

31. Inrätta minst tre uppsättningar flaskor med endast slam och substrat som fungerar som kontroller. Inrätta ytterligare replikatflaskor som innehåller slam och substrat plus tillräckligt med stamlösning av referenskemikalien 3,5-diklorfenol (punkt 21) tills man erhåller en slutkoncentration på 150 mg/l. Denna koncentration bör hämma produktionen med omkring 50 %. Som ett alternativ kan man inrätta en serie koncentrationer av referenskemikalien. Inrätta dessutom fyra extra flaskor för pH-mätning som innehåller slam, syrefritt vatten och substrat. Tillsätt testkemikalien i två flaskor med den högsta koncentrationen som testas och tillsätt syrefritt vatten i de återstående två flaskorna.

32. Se till att alla flaskor – test- och referenskemikalier samt kontrollerna – innehåller samma volym (V_R) vätska. Tillsätt vid behov syrefritt avjonat vatten (punkt 14) för att få korrekt volym. Gasutrymmet bör utgöra mellan 10 % och 40 % av flaskans volym (det faktiska värdet ska väljas från de uppgifter som erhållits från det preliminära testet). Efter att alla komponenterna har tillsatts i flaskorna avlägsnas kanylen som tillhandahåller gasen och varje flaska förseglas med en gummipropp och ett aluminiumlock (punkt 12 b). Proppen fuktas med avjonat vatten för att underlätta införandet. Blanda innehållet i varje flaska genom skakning.

Inkubering av flaskorna

33. Flytta över flaskorna till en termostatreglerad inkubator, som helst bör vara försedd med en skakapparat, och bibehåll en temperatur på 35 ± 2 °C. Flaskorna inkuberas i mörker. Jämna efter ca 1 timme ut trycket i flaskorna till atmosfären genom att införa en kanyl kopplad till en tryckmätare (punkt 12 c) genom förseglingen på varje enskild flaska. Öppna ventilen tills tryckmätaren visar noll och stäng sedan ventilen. Nålen bör införas i en vinkel på ungefär 45° för att förhindra att gas läcker ut från flaskorna. Om flaskorna inkuberas utan skakapparat ska de skakas manuellt två gånger per dag under hela inkuberingen så att systemet hålls i jämvikt. Inkubera flaskorna och vänd dem upp och ner för att förhindra gasförlust genom septumet. Det är dock inte lämpligt att vända flaskorna upp och ner om man riskerar att olösliga testkemikalier bildar en beläggning i botten.

Tryckmätning

34. När flaskorna har nått temperaturen 35 ± 2 °C mäts och registreras innehållets pH-värde i två av de fyra flaskor som har inrättats för detta syfte. Innehållet kasseras sedan. Fortsätt att inkubera de återstående flaskorna i mörker. Mät och registrera trycket i flaskorna två gånger om dagen under de följande 48 till 72 timmarna genom att föra in tryckmätarens nål genom förseglingen i var flaska för sig, och torka av nålen mellan mätningarna. Håll alla delarna av flaskan vid inkuberingstemperatur under mätningen, som bör genomföras så snabbt som möjligt. Låt tryckavläsningen stabiliseras och registrera den. Öppna sedan ventilen för tryckutjämning och stäng den när trycket mäter noll. Fortsätt testet i normalt 48 timmar från den tidpunkt då trycket först utjämnades, vilken betecknas med ”0”. För flyktiga kemikalier bör antalet avläsningar och tryckutjämningar begränsas till en (vid inkuberingens slut) eller två för att minimera förlusten av testkemikalien (10).

35. Öppna inte ventilen om tryckmätningen ger ett negativt värde. Fukt ansamlas ibland i kanylen och dithörande slangar, och detta visar sig i form av ett litet undertryck vid mätning. Avlägsna i detta fall nålen, skaka slangarna, torka med mjukt papper och sätt i en ny nål.

pH-mätning

36. Mät och registrera pH-värdet i varje flaska efter den sista tryckmätningen.

▼M6

DATA OCH RAPPORTERING

Resultatredovisning

37. Beräkna summan och genomsnittet av de tryck som registrerats under varje tidsintervall för varje uppsättning replikatflaskor och beräkna det genomsnittliga kumulativa bruttogastrycket under varje tidsintervall för varje uppsättning replikat. Plotta sedan kurvor som visar den genomsnittliga sammanlagda gasproduktionen (Pa) mot tiden för kontroll-, test- och referensflaskorna. Välj en tid på den linjära delen av kurvan, normalt 48 timmar, och beräkna den procentuella hämningen (I) för varje koncentration med hjälp av formeln [1]

$$I = (1 - P_t/P_C) \times 100 \quad [1],$$

där

I = den procentuella hämningen, i %,

P_t = det gastryck som alstras med testmaterialet vid en utvald tidpunkt, i pascal (Pa),

P_c = det gastryck som alstras i kontrollen vid samma tidpunkt, i pascal (Pa).

Det rekommenderas att man ritar båda plottarna, dvs. plotta I mot koncentrationen och även mot logaritmen till koncentrationen så att man kan välja ut den kurva som är mest lineär. Bestäm EC_{50} (mg/l) visuellt eller genom regressionsanalys utifrån den kurva som är mest lineär. I jämförande syfte kan det vara bättre att uttrycka kemikaliens koncentration i mg/g av den totala torrsubstansen. För att uppnå denna koncentration delar man den volymetriska koncentrationen (mg/l) med den volymetriska koncentrationen av slammets torrsubstans (g/l) (punkt 16).

38. Beräkna antingen den procentuella hämning som erhålls med den enda koncentrationen av den använda referenskemikalien eller EC_{50} om ett tillräckligt antal koncentrationer har undersökts.

39. Omvandla det genomsnittliga trycket hos den gas som produceras i kontrollen P_c (Pa) till volymen genom hänvisning till tryckmätarens kalibreringskurva (tillägg 2), och beräkna utifrån denna den producerade mängden gas, uttryckt som den volym som produceras under 48 timmar ur 100 ml outspätt slam vid en koncentration torrsubstans på 2 % (20 g/l) till 4 % (40 g/l).

Kriterier för testresultatens giltighet

40. Resultaten från ISO:s jämförelse mellan laboratorier (5) visade att referenskemikalien (3,5-diklorfenol) orsakade en 50-procentig hämning av gasproduktionen i en serie koncentrationer på 32–510 mg/l, med medelvärdet 153 mg/l (punkt 10). Detta intervall är så brett att det inte går att fastställa fasta gränser för hämningen som giltighetskriterier. Detta bör dock vara möjligt när utvecklingen kommit så långt att man kan producera enhetligare inokulat. Den mängd gas som produceras i kontrollflaskorna under 48 timmar varierade från 21 ml/g torrsubstans slam till 149 ml/g (medelvärde 72 ml/g). Det fanns inte något uppenbart samband mellan den volym gas som producerades och det motsvarande EC_{50}-värdet. Det slutliga pH-värdet varierade mellan 6,1 och 7,5.

41. Testet anses vara giltigt om en hämning på mer än 20 % erhålls i den referenskontroll som innehåller 150 mg/l 3,5-diklorfenol, mer än 50 ml gas per g torrvikt produceras i blankprovet och pH-värdet ligger inom intervallet 6,2–7,5 vid testets slut.

Testrapport

42. Testrapporten ska innehålla följande uppgifter:

Testkemikalie

— trivialnamn, kemiskt namn, CAS-nummer, strukturformel och relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper,

▼M6

— testkemikaliens renhet (orenheter i testkemikalien).

Testbetingelser

— de flytande beståndsdelarnas volymer och gasutrymmets volym i testkärlen,

— beskrivningar av testkärlen och mätningen av gaser (t.ex. typ av tryckmätare),

— appliceringen av test- och referenskemikalien i testsystemet, de testkoncentrationer som använts och eventuell användning av lösningsmedel,

— detaljer om inokulatet: reningsverkets namn, beskrivning av källan för det avloppsvatten som behandlats (t.ex. driftstemperatur, slammets retentionstid, huvudsakligen avloppsvatten från hushåll eller industrier etc.), koncentration torrsubstans, gasproduktionsaktiviteten i den anaeroba rötkammaren, tidigare exponering för eller möjlig tidigare anpassning till toxiska kemikalier, insamlingsplats för gyttja, sediment etc.,

— inkuberingstemperatur och temperaturintervall,

— antal replikat.

Resultat

— pH-värden vid testets avslutning,

— alla uppmätta data som insamlats från kontrollkärlen för testkemikalien, blankprovet och referenskemikalien i lämplig enhet (t.ex. tryck i Pa eller millibar) i tabellform,

— procentuell hämning i test- och referensflaskorna, och hämning/koncentrationskurvorna,

— beräkning av EC_{50}-värden, uttryckt i mg/l och mg/g,

— gasproduktion per gram slam under 48 timmar,

— motivering för eventuella förkastade testresultat,

— diskussion av resultaten, inklusive eventuella avvikelser från förfarandena i denna testmetod; diskutera även eventuella avvikelser i testresultaten från vad man skulle kunna förvänta sig på grund av störningar och fel,

— ange även om syftet med testet var att mäta toxiciteten antingen för förhandsexponerade eller icke förhandsexponerade mikroorganismer.

LITTERATUR

(1) Kapitel C.11 i denna bilaga: Aktiverat slam – respirationshämningstest.

(2) Kapitel C.43 i denna bilaga: Anaerob nedbrytbarhet av organiska föreningar i rötslam: metod genom mätning av gasproduktionen.

(3) Internationella standardiseringsorganisationen (2003) ISO 13641-1 Water Quality – Determination of inhibition of gas production of anaerobic bacteria – Part 1: General Test.

(4) Internationella standardiseringsorganisationen (2003) ISO 13641-2 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 13641-1 and ISO 13641-2. Determination of inhibition of activity of anaerobic bacteria. BL 6958/A. Evans, M. R. och Painter, H. A. Brixham Environmental Laboratory, AstraZeneca UK Ltd., Brixham, TQ5 8BA UK.

▼**M6**

(6) Swanwick, J. D. och Foulkes, M. (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, i: Methods for the Examination of Waters and Associated Materials, Storbritannien.

(8) Shelton, D.R. och Tiedje, J. M. (1984). General method for determining anaerobic biodegradation potential. Appl. Env. Microbiol. 47 850–857.

(9) Battersby, N. S. och Wilson, V. (1988). Evaluation of a serum bottle technique for assessing the anaerobic biodegradability of organic compounds under methanogenic conditions. Chemosphere 17, 2441–2460.

(10) Wilson, V., Painter, H. A. och Battersby, N. S. (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). Redaktörer: Steinberg, C. och Kettrup, A., s. 117–132 (1992).

(11) Kawahara, K., Yakabe, Y., Chida, T. och Kida, K. (1999). Evaluation of laboratory-made sludge for an anaerobic biodegradability test and its use for assessment of 13 chemicals. Chemosphere, 39 (12), 2007–2018.

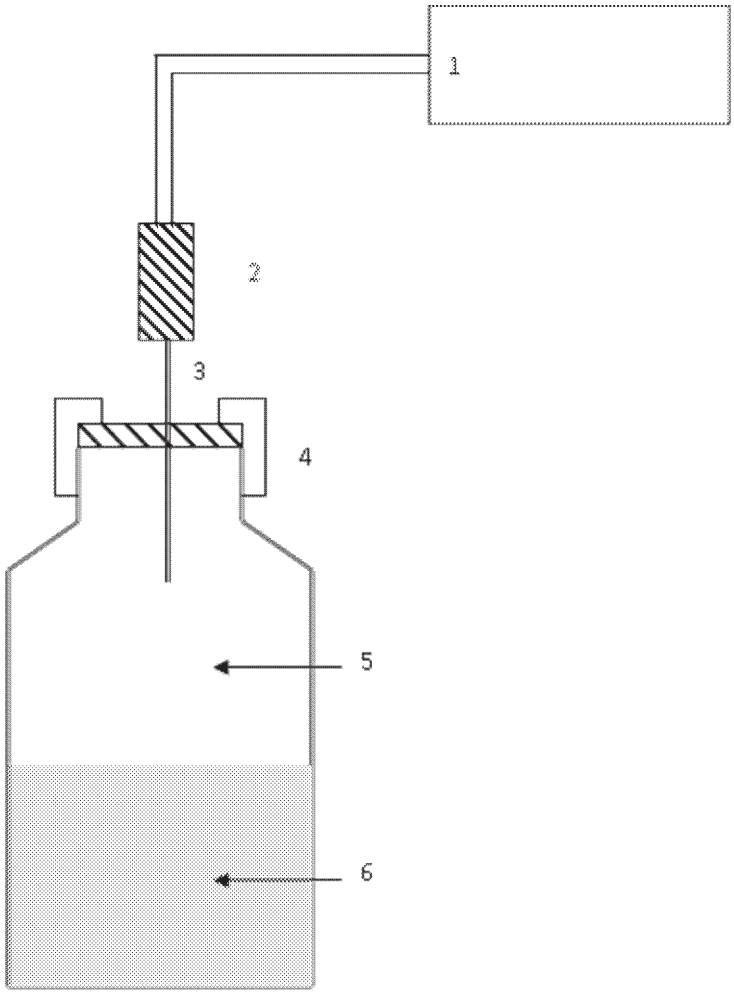
(12) Internationella standardiseringsorganisationen (1995) ISO 10634 Vattenundersökningar – Handledning för beredning och handhavande av i vatten svårlösliga organiska föreningar för efterföljande utvärdering av deras bionedbrytbarhet i vattenlösning.

(13) Internationella standardiseringsorganisationen (1997) ISO 11923 Water Quality – Determination of suspended solids by filtration through glass-fibre filters.

▼**M6**

Tillägg 1

Exempel på utrustning för mätning av biogasproduktion via gastrycket



Teckenförklaring:

1 – Tryckmätare

2 – Gastät trevägsventil

3 – Kanyl

4 – Gastät förslutning (kraglock och septum)

5 – Gasutrymme

6 – Rötslaminokulat

Testkärl i en miljö med temperaturen 35 ± 2 °C

▼M6

Tillägg 2

Omvandling av tryckmätningarna

Avläsningarna från tryckmätaren kan relateras till gasvolymerna genom en standardkurva och utifrån denna kan man beräkna den volym gas som produceras per g torrvikt slam per 48 timmar. Detta aktivitetsindex används som ett av kriterierna för att bedöma testresultatens giltighet. Kalibreringskurvan framställs genom att man injicerar kända volymer gas vid 35 ± 2 °C i injektionsflaskor som innehåller samma mängd vatten som reaktionsblandningen, V_R.

— Fördela alikvoter på V_R ml vatten som bibehålls vid 35 ± 2 °C i fem injektionsflaskor. Tillslut flaskorna och placera dem i vattenbad vid 35 ± 2 °C i 1 timme så att jämvikt uppnås.

— Slå på tryckmätaren, låt den stabiliseras och justera till noll.

— För in kanylen genom förseglingen på en av flaskorna, öppna ventilen tills tryckmätaren visar noll och stäng ventilen.

— Upprepa detta förfarande med de återstående flaskorna.

— Injicera 1 ml luft vid 35 ± 2 °C i varje flaska. För in nålen (på mätaren) genom förseglingen på en av flaskorna och låt tryckavläsningen stabiliseras. Registrera trycket, öppna ventilen tills trycket mäter noll och stäng därefter ventilen.

— Upprepa detta förfarande med de återstående flaskorna.

— Upprepa hela förfarandet med 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 8 ml, 10 ml, 12 ml, 16 ml, 20 ml respektive 50 ml luft.

— Rita en omvandlingskurva över trycket (Pa) mot den insprutade gasvolymen (ml). Mätresultaten från instrumentet är linjära i intervallet mellan 0 Pa till 70 000 Pa, och 0 ml till 50 ml gasproduktion.

▼M6

Tillägg 3

Identifierade faktorer som kan leda till felaktiga resultat

(a) *Kvaliteten på flaskornas korkar*

Olika typer av septum för injektionsflaskorna finns kommersiellt tillgängliga, men många av dem, t.ex. butylgummi, förlorar sin täthet när de genomborras av en nål under betingelserna i detta test. Ibland sjunker trycket mycket långsamt när kanylen har införts genom septumet. Användning av gastäta septum rekommenderas för att undvika läckor (punkt 12 b).

(b) *Fukt i kanylen*

Fukt ansamlas ibland i kanylen och dithörande slangar, och detta visar sig i form av ett litet undertryck vid mätning. Avlägsna kanylen för att korrigera detta, skaka slangarna, torka med mjukt papper och sätt i en ny kanyl (punkterna 12 c och 35).

(c) *Kontaminering med syre*

Anaeroba metoder är känsliga för fel som härrör från kontaminering med syre, vilket kan leda till lägre gasproduktion. I denna metod bör denna möjlighet minimeras genom användningen av uteslutande anaeroba tekniker, inbegripet användning av en handskbox.

(d) *Grovt substrat i slammet*

Den anaeroba gasproduktionen och slammets känslighet påverkas av substrat som överförs med inokulatet till testflaskorna. Rötslam från privata anaeroba rötkammare innehåller ofta igenkännbart material som hår och växtrester av cellulosa, som brukar göra det svårt att ta representativa prover. Genom siktning av slammet kan grova olösliga material avlägsnas, vilket gör det mer sannolikt att de prov som tas är representativa (punkt 16).

(e) *Flyktiga testkemikalier*

Flyktiga testkemikalier kommer att släppas ut i gasutrymmet i testflaskorna. Detta kan leda till förlust av en del av testmaterialet från systemet under avluftning efter tryckmätningarna, vilket ger felaktigt höga EC_{50}-värden. Genom ett lämpligt val av andelen gasutrymme jämfört med vätskevolymen och genom att inte släppa ut trycket efter tryckmätningarna kan felet minskas (10).

(f) *Gasproduktionens icke-linjäritet*

Om den plott som visar den genomsnittliga sammanlagda gasproduktionen mot inkuberingstiden inte är ungefärligen linjär under en 48-timmarsperiod, kan testets noggrannhet sänkas. För att lösa detta problem kan det vara tillrådligt att använda rötslam från en annan källa och/eller öka koncentrationen i testsubstrat-näringslösningen, jästextraktet och glukosen (punkt 29).

▼M6

Tillägg 4

Tillämplighet på miljöprover med låg koncentration av biomassa – anaerob gyttja, sediment etc.

INLEDNING

A.1 I allmänhet är den särskilda mikrobiella aktiviteten (volym gas som produceras per gram torrsubstans) i naturligt förekommande anaerob gyttja, sediment, jord etc. mycket lägre än i anaerobt slam som härrör från avloppsvatten. På grund av detta kan vissa experimentella förhållanden behöva ändras när den hämmande effekten av kemikalier på dessa mindre aktiva prover ska mätas. För dessa mindre aktiva prover kan någon av följande allmänna åtgärder vidtas:

(a) Utför ett modifierat preliminärt test (punkt 25) med det outspädda provet med gyttja, jord etc. vid 35 ± 2 °C eller vid temperaturen på insamlingsplatsen för provet för att erhålla en mer noggrann simulering (som i del 1 i ISO 13641).

(b) Genomför testet med utspätt (1:100) rötkammarslam för att simulera den låga aktivitet som förväntas från miljöprovet, men håll temperaturen vid 35 ± 2 °C (som i del 2 i ISO 13641).

A.2 Alternativ (a) kan utföras med hjälp av den metod som beskrivs här (motsvarande del 1 i ISO 13641), men det är viktigt att göra ett preliminärt test (punkt 25) för att fastställa de optimala förhållandena, såvida inte dessa redan är kända från tidigare tester. Gyttjan eller sedimentet bör blandas ordentligt, t.ex. i en blandare, och, om så krävs, spädas med en liten andel avluftat utspädningsvatten (punkt 14) så att den är tillräckligt rörlig för att kunna överföras med en pipett med bred spets eller en mätcylinder. Om man anser att näringsämnen eventuellt saknas, kan gyttjeprovet centrifugeras (under anaeroba förhållanden) och återsuspenderas i ett oorganiskt medium innehållande jästextrakt (A.11).

A.3 Alternativ (b). Detta efterliknar rimligen den låga aktiviteten i miljöproverna men saknar den höga koncentration av suspenderade fasta ämnen som finns i dessa prov. Den roll som dessa fasta ämnen spelar för hämningen är inte känd, men det är möjligt att reaktioner mellan testkemikalierna och beståndsdelarna i gyttjan, liksom adsorption av testkemikalien till de fasta ämnena, skulle kunna leda till en sänkning av testkemikaliens toxicitet.

A.4 Temperatur är en annan viktig faktor: För en strikt simulering bör testerna göras vid den temperatur som uppmäts på insamlingsplatsen, eftersom olika grupper av metanproducerande bakteriekonsortier är kända för att vara aktiva inom olika temperaturintervaller, nämligen termofiler (ung. 30–35 °C), mesofiler (20–25 °C) och psykrofiler (< 20 °C), vilket kan göra att olika hämningsmönster uppvisas.

A.5 Varaktighet. I det allmänna testet, del 1, med outspätt slam producerades tillräckligt med gas på två till fyra dagar, medan det i del 2 med slam utspätt 1:100 producerades otillräckliga mängder gas eller ingen gas alls under denna period i ringtestet. I sin beskrivning av det senare testet anger Madsen m.fl. (1996) att man ska sätta av minst sju dagar för detta.

Testning med låg koncentration av biomassa (alternativ b)

Följande ändringar bör göras för att komplettera eller ersätta vissa befintliga punkter och stycken i huvudtexten.

▼M6

A.6 Lägg till i punkt 6: Princip för testmetoden

”Denna teknik kan användas med anaerobt slam utspätt 1:100, delvis för att simulera den låga aktiviteten i gyttja och sediment. Inkuberingstemperaturen kan antingen vara 35 °C eller temperaturen på den plats där provet samlades in. Eftersom bakterieaktiviteten är mycket lägre än i outspätt slam bör inkuberingstiden förlängas till minst sju dagar.”

A.7 Lägg till i punkt 12 a:

”inkubatorn ska kunna fungera ner till en temperatur på 15 °C.”

A.8 Lägg till en extra reagens efter punkt 13:

”Fosforsyra (H_3PO_4), 85 % i vikt i vatten.”

A.9 Lägg till följande i slutet av punkt 16:

”Använd en slutkoncentration på 0,20 ± 0,05 g/l total torrsubstans i testet.”

A.10 Punkt 17. Testsubstrat

Detta substrat ska inte användas, utan ersätts med jästextrakt (se punkterna 17, A.11, A.12 och A.13).

A.11 Det behövs ett oorganiskt medium, inklusive spårämnen, för utspädning av anaerobt slam, och för enkelhetens skull tillsätts det organiska substratet, jästextrakt, till detta medium.

Lägg till efter punkt 17:

”(a) Oorganiskt testmedium, med jästextrakt.

Detta bereds från ett testmedium med tio gånger så hög koncentration (punkterna 17 b och A.12) med en spårelementlösning (punkterna 17 c och A.13). Använd nyanskaffad natriumsulfidnonahydrat (punkterna 17 b och A.12) eller tvätta och torka den före användning för att säkerställa att den har tillräcklig hämningskapacitet. Om testet utförs utan användning av en handskbox (punkt 12 j) bör koncentrationen av natriumsulfid i stamlösningen ökas till 2 g/l (från 1 g/l). Natriumsulfid kan också tillsättas från en lämplig stamlösning genom de förslutna testflaskornas septum, eftersom detta förfarande minskar risken för oxidering, för att erhålla en slutkoncentration på 0,2 g/l. Alternativt kan titan(III)citrat (punkt 17 b) användas. Tillsätt det genom de förslutna testflaskornas septum tills en koncentration på mellan 0,8 mmol/l och 1,0 mmol/l erhålls. Titan(III)citrat är ett mycket effektivt och lågtoxiskt reduktionsmedel som bereds på följande sätt: Lös 2,94 g trinatriumcitratdihydrat i 50 ml syrefritt utspädningsvatten (punkt 14) (vilket ger en 200 mmol/l lösning) och tillsätt 5 ml titan(III)kloridlösning (15 g/100 ml utspädningsvatten). Neutralisera till pH 7 ± 0,5 med natriumkarbonat och fördela i en lämplig injektionsflaska under en ström av kvävgas. Koncentrationen av titan(III)citrat i denna stamlösning är 164 mmol/l. Använd testmediet omedelbart eller förvara vid 4 °C i högst en dag.

A.12 (b) Tiofalt koncentrerat testmedium, berett med följande:

vattenfritt kaliumdivätefosfat (KH_2PO_4)	2,7 g
dinatriumvätefosfat (Na_2HPO_4)	4,4 g
(eller 11,2 g dodekahydrat)	5,3 g
ammoniumklorid (NH_4CI)	

▼**M6**

kalciumkloriddihydrat ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	0,75 g
magnesiumkloridhexahydrat ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$)	1,0 g
järn(II)kloridtetrahydrat ($FeCl_2 \cdot 4H_2O$)	0,2 g
resazurin (redoxindikator)	0,01 g
natriumsulfidnonahydrat ($Na_2S \cdot 9H_2O$)	1,0 g
(eller titan(III)citrat) slutlig koncentration	0,8–1,0 mmol/l
spårelementlösning (se punkterna 17 c och A.13)	10,0 ml
jästextrakt	100 g
Lös i utspädningsvatten (punkt 14) och späd till	1 000 ml

A.13 (c) Spårelementlösning som beretts med följande:

mangan(II)kloridtetrahydrat ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$)	0,5 g
ortoborsyra (H_3BO_3)	0,05 g
zinkklorid ($ZnCl_2$)	0,05 g
koppar(II)klorid ($CuCl_2$)	0,03 g
natriummolybdatdihydrat ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$)	0,01 g
kobolt(II)kloridhexahydrat ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$)	1,0 g
nickel(II)kloridhexahydrat ($NiCl_2 \cdot 6H_2O$)	0,1 g
dinatriumselenit (Na_2SeO_3)	0,05 g
Lös i utspädningsvatten (punkt 14) och späd till	1 000 ml”

A.14 Punkt 25: Preliminärt test

Det är viktigt att ett preliminärt test utförs så som beskrivs i punkt 24, förutom att koncentrationen fasta ämnen i slammet bör vara en hundradel av det som anges, dvs. 0,1 g/l, 0,2 g/l och 0,4 g/l. Inkuberingstiden bör vara minst sju dagar.

Anmärkning: I ringtestet (5) var gasutrymmet alldeles för stort med 75 % av den totala volymen. Det bör i stället ligga inom det rekommenderade intervallet på 10–40 %. Det relevanta kriteriet är att den volym gas som produceras vid omkring 80 % hämning bör vara mätbar med godtagbar precision (t.ex. ± 5 % till ± 10 %).

A.15 Punkterna 26 till 30: Tillsättning av testämne, inokulat och substrat.

Dessa tillsatser görs på samma sätt som beskrivs i dessa punkter, men substratlösningen (punkt 17) ersätts av testmediet plus jästextraktsubstrat (A.11).

Den slutliga koncentrationen av slammets torrsubstans minskas dessutom från 2–4 g/l till 0,2 ± 0,05 g/l (A.9). Två exempel på tillsättning av beståndsdelar i testblandningen ges i tabell A.1, som ersätter tabellen i punkt 29.

A.16 Punkt 33: Inkubering av flaskorna

På grund av den förväntat lägre gasproduktionshastigheten pågår inkuberingen i minst sju dagar.

▼M6

A.17 Punkt 34: Tryckmätningar

Samma förfarande för att mäta trycket i gasutrymmet i flaskorna ska användas som i beskrivningen i punkt 34 om mängderna i gasfasen måste mätas. Om de totala mängderna för CO_2 plus CH_4 ska mätas sänks pH-värdet i vätskefasen till ca pH 2 genom injektion av H_3PO_4 i varje relevant flaska och mätning av trycket efter 30 minuters omskakning vid testtemperaturen. Emellertid kan mer information om kvaliteten på inokulatet erhållas genom mätning av trycket i varje flaska före och efter surgörning. När till exempel produktionshastigheten för CO_2 är mycket högre än den för metan kan känsligheten hos jäsningsbakterierna ändras, och/eller främst metanbildande bakterier påverkas av testkemikalien.

A.18 Punkt 36: Mätning av pH-värdet

Om H_3PO_4 ska användas måste en del extra flaskor, i vilka H_3PO_4 inte tillsätts, inrättas särskilt för pH-mätning.

HÄNVISNING:

Madsen, T., Rasmussen, H. B och Nilsson, L. (1996), Methods for screening anaerobic biodegradability and toxicity of organic chemicals. Projekt nr 336, Vandkvalitetsinstituttet, danska miljöstyrelsen, Köpenhamn.

Tabell A.1

Exempel på testuppställning för testgrupper

Reaktionsblandning, beståndsdelar	Exempel 1	Exempel 2	Normal tillsatsordning
Det beredda inokulatets koncentration (g/l)	0,42	2,1	—
Det tillsatta inokulatets volym (ml)	45	9	4
Inokulatets koncentration i testflaskorna (g/l)	0,20	0,20	—
Det tillsatta testmediets volym (ml)	9	9	2
Det tillsatta utspädningsvattnets volym (ml)	36	72	3
Jästextraktets koncentration i testflaskorna (g/l)	9,7	9,7	—
Volym för stamlösningen med testkemikalie (ml)	3	3	1
Total vätskevolym (ml)	93	93	—

▼**M6**

Tillägg 5

Definitioner

I denna testmetod gäller följande definitioner:

Kemikalie: ett ämne eller en blandning.

Testkemikalie: alla ämnen eller blandningar som testas med denna testmetod.

▼M6

C.35 TOXICITETSTEST I SEDIMENT- OCH VATTENFAS FÖR *LUMBRICULUS* MED SPIKAT SEDIMENT

INLEDNING

1. Denna testmetod motsvarar OECD:s testriktlinje (TG) 225 (2007). Sedimentförtärande endobentiska djur utsätts för potentiellt höga exponeringar av sedimentbundna kemikalier, och man bör därför ägna dessa ökad uppmärksamhet, t.ex. (1), (2), (3). Bland dessa sedimentförtärare spelar de vattenlevande oligochaeterna en viktig roll i vattensystemens sediment. Genom att dessa sköter bioturberingen av sediment och även har rollen som bytesdjur kan de ha en stark inverkan på biotillgängligheten av sådana kemikalier för andra organismer, t.ex. bentivora fiskar. I motsats till de epibentiska organismerna gräver endobentiska vattenlevande oligochaeter (t.ex. *Lumbriculus variegatus*) sig fram genom sedimentet, och förtär sedimentpartiklar under sedimentytan. Detta gör att testorganismerna exponeras för testkemikalien via alla tänkbara upptagningsvägar (t.ex. kontakt med och intag av förorenade sedimentpartiklar, men även via porvatten och överliggande vatten).

2. Syftet med testmetoden är att bedöma effekterna av långvarig exponering för sedimentbundna kemikalier på den endobentiska oligochaeten *Lumbriculus variegatus* (Müller). Metoden bygger på befintliga testprotokoll för sedimenttoxicitet och bioackumulering, t.ex. (3), (4), (5), (6), (7), (8), (9), (10). Metoden beskrivs för statiska testbetingelser. Exponeringsscenariot i denna testmetod går ut på att kontaminera sedimentet med testkemikalien. Det spikade sedimentet är avsett att simulera ett sediment som är förorenat med testkemikalien.

3. Kemikalier som behöver testas på sedimentlevande organismer är vanligen sådana som blir kvar i sedimentet under långa tidsperioder. Sedimentlevande organismer kan exponeras via ett antal vägar. Den relativa betydelsen av varje exponeringsväg och den tid det tar för var och en av dem att bidra till de totala toxiska effekterna beror på den berörda kemikaliens fysikaliskkemiska egenskaper och dess slutliga omvandling, spridning och fördelning i djuret. För starkt adsorberande kemikalier (t.ex. log K_{ow} > 5) eller för kemikalier som binds kovalent till sedimentet, kan förtäring av förorenad föda vara en betydande exponeringsrutt. För att inte underskatta toxiciteten av sådana kemikalier tillsätts det foder som krävs för testorganismernas reproduktion och tillväxt till sedimentet före applicering av testkemikalien (11). Den testmetod som beskrivs är tillräckligt detaljerad så att testet kan utföras samtidigt som man ger utrymme för anpassningar av testutformningen beroende på förhållandena i enskilda laboratorier och testkemikaliernas varierande egenskaper.

4. Testmetoden syftar till att fastställa effekterna av en testkemikalie på testorganismernas reproduktion och biomassa. De uppmätta biologiska parametrarna är det totala antalet överlevande maskar och biomassan (torrvikt) i slutet av exponeringen. Dessa data analyseras genom användning antingen av en regressionsmodell i syfte att uppskatta den koncentration som framkallar en effekt på x % (t.ex. EC_{50}, EC_{25} och EC_{10}) eller genom användning av statistisk hypotesprövning för att bestämma den högsta koncentrationen utan observerad effekt (NOEC) och den lägsta koncentrationen med observerad effekt (LOEC).

5. Kapitel C.27 i denna bilaga, ”Toxicitetstest i sediment- och vattenfas på chironomidlarver med spikat sediment” (6), innehåller många viktiga och användbara detaljer om hur man kan genomföra den beskrivna testmetoden för sedimenttoxicitet. Detta dokument ligger sålunda till grund för utarbetandet av de ändringar som var nödvändiga för att kunna genomföra sedimenttoxicitetstester med *Lumbriculus variegatus*. Andra dokument som det hänvisas till här är t.ex. *ASTM Standard Guide for Determination of the*

▼M6

Bioaccumulation of Sediment-Associated Contaminants by Benthic Invertebrates (3), den amerikanska miljöskyddsmyndighetens (EPA) *Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates* (7), samt *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). Dessutom har praktiska erfarenheter som förvärvats när testmetoden ringtestades ((13), ringtestrapport), och uppgifter från referenslitteraturen utgjort viktiga informationskällor när detta dokument utarbetades.

FÖRUTSÄTTNINGAR OCH VÄGLEDANDE INFORMATION

6. Information om testkemikalien, såsom säkerhetsåtgärder, lämpliga lagringsförhållanden och analysmetoder, bör inhämtas innan studien inleds. Vägledning för testning av kemikalier vars fysikalisk-kemiska egenskaper gör det svårt att genomföra detta test finns i (14).

7. Innan ett test utförs bör följande upplysningar om testkemikalien finnas tillgängliga:

— trivialnamn, kemiskt namn (helst enligt IUPAC), strukturformel, CAS-nummer, renhet,

— ångtryck,

— vattenlöslighet.

8. Dessutom anses följande information vara användbar innan testet inleds:

— fördelningskoefficient oktanol/vatten, K_{ow},

— fördelningskoefficient organiskt kol/vatten, uttryckt som K_{oc},

— hydrolys,

— fotolys i vatten,

— bionedbrytbarhet,

— ytspänning.

9. Information om vissa egenskaper hos de sediment som ska användas bör förvärvas innan testet inleds (7). För närmare information, se punkterna 22–25.

PRINCIP FÖR TESTMETODEN

10. Maskar i liknande fysiologiska stadier (synkroniserade som beskrivs i tillägg 5) exponeras för en serie koncentrationer av ett giftämne som tillsätts i sedimentfasen av sediment/vattensystemet. Syntetiskt sediment och rekonstituerat vatten bör användas som media. Testkärl utan tillsats av testkemikalien fungerar som kontroller. Sedimentet spikas med testkemikalien i bulk för varje koncentrationsnivå i syfte att minimera variabiliteten mellan replikaten för varje koncentrationsnivå, och testorganismerna tillförs därefter i testkärlen, i vilka koncentrationen för vatten och sediment har bringats i jämvikt (se punkt 29). Försöksdjuren exponeras för sediment/vattensystemen under en period på 28 dagar. Med hänsyn till det syntetiska sedimentets låga näringsvärde bör ett foder tillsättas sedimentet (se punkterna 22–23 och tillägg 4) för att se till att maskarna ska växa och reproducera sig under kontrollerade villkor. På detta sätt säkerställer man att försöksdjuren exponeras via vattnet och sedimentet såväl som genom deras föda.

11. Den lämpligaste endpointen i denna typ av undersökning är EC_x (t.ex. EC_{50}, EC_{25} och EC_{10} – effektkoncentrationen, den koncentration som påverkar x % av försöksdjuren) för reproduktion respektive biomassa jämfört med kontrollen. Man bör dock notera att EC_{50} anses vara den mest tillförlitliga

▼M6

endpointen med tanke på den höga osäkerheten hos låga EC_x-värden (t.ex. EC_{10}, EC25) med extremt höga 95-procentiga konfidensgränser (t.ex. (15)) och den statistiska styrka som beräknats under hypotesprövningen. Dessutom kan den högsta koncentrationen utan observerad effekt (NOEC) och den lägsta koncentrationen med observerad effekt (LOEC) beräknas för biomassan och reproduktionen om testupplägget och uppgifterna stöder dessa beräkningar (se punkterna 34–38). Syftet med studien – att fastställa EC_x eller NOEC – avgör testupplägget.

REFERENSTESTNING

12. Kontrollorganismernas beteende förväntas vara ett tillräckligt bevis på ett laboratoriums förmåga för att utföra testet, och, om historiska uppgifter finns tillgängliga, testets repeterbarhet. Dessutom kan toxicitetstester genomföras med jämna mellanrum med hjälp av ett referensgiftämne för att bedöma känsligheten hos testorganismerna. Endast 96-timmars referenstoxicitetstester i vatten kan på ett tillfredsställande sätt påvisa försöksdjurens känslighet och tillstånd (4) (7). Information om toxiciteten för pentaklorfenol (PCP) i fullständiga tester (28-dagars exponering för spikat sediment) finns att tillgå i tillägg 6, och i rapporten om testmetodens ringtest (13). Den akuta toxiciteten av pentaklorfenol i endast vatten beskrivs t.ex. i (16). Denna information kan användas för jämförelser av testorganismens känslighet i referenstester med PCP som referensgiftämne. Kaliumklorid (KCl) eller kopparsulfat ($CuSO_4$) har rekommenderats som referensgiftämnen för *L. variegatus* (4) (7). Hittills har det varit svårt att fastställa kvalitetskriterier grundat på toxicitetsdata för KCl på grund av bristande uppgifter i litteraturen för *L. variegatus*. Information om toxiciteten av koppar för *L. variegatus* finns i (17) till (21).

TESTETS GILTIGHET

13. För att testet ska vara giltigt måste följande krav vara uppfyllda:

— Resultaten från ett ringtest (13) har visat att för *Lumbriculus variegatus* bör det genomsnittliga antalet levande maskar per replikat i kontrollerna ha ökat med en faktor på minst 1,8 i slutet av exponeringen jämfört med antalet maskar per replikat i början av exponeringen.

— pH i överliggande vatten bör vara mellan 6 och 9 under hela testet.

— Syrekoncentrationen i överliggande vatten bör vara minst 30 % av luftmättnadsvärdet (ASV) vid testtemperaturen under testets gång.

BESKRIVNING AV TESTMETODEN

Testsystem

14. Statiska system utan förnyelse av överliggande vatten rekommenderas. Om förhållandet mellan sediment och vatten (se punkt 15) är lämpligt räcker det normalt med försiktig luftning för att hålla vattenkvaliteten på godtagbara nivåer för testorganismerna (t.ex. maximera halten löst syre, minimera ackumuleringen av avfallsprodukter). Semistatiska system eller genomflödessystem med periodisk eller kontinuerlig förnyelse av det överliggande vattnet bör endast användas i undantagsfall, eftersom regelbunden förnyelse av överliggande vatten förväntas påverka den kemiska jämvikten (t.ex. förlust av testkemikalien från testsystemet).

Testkärl och apparater

15. Exponeringen bör genomföras i glasbägare på t.ex. 250 ml som mäter 6 cm i diameter. Andra lämpliga glaskärl kan användas, men det måste gå att garantera att det överliggande vattnet och sedimentet har ett lämpligt djup.

▼M6

Varje kärl ska ha ett skikt på ca 1,5–3 cm syntetiskt sediment. Förhållandet mellan sedimentskiktets djup och det överliggande vattnets djup bör vara 1:4. Kärlens kapacitet ska vara anpassad efter djurtätheten, dvs. antalet testmaskar som tillsätts per viktenhet sediment (se även punkt 39).

16. Testkärl och annan apparatur som kommer i kontakt med testkemikalien bör vara tillverkade uteslutande av glas eller annat kemiskt inert material. För all utrustning gäller att man nogsamt bör undvika användning av material som kan lösas upp, absorbera testkemikalien eller läcka andra kemikalier och ha negativa effekter på försöksdjuren. Polytetrafluoreten (PTFE), rostfritt stål och/eller glas kan användas för all utrustning som kommer i kontakt med testmediet. För organiska kemikalier som är kända för att adsorberas till glas kan det vara nödvändigt att använda silaniserat glas. I dessa fall ska utrustningen kasseras efter användningen.

Testarter

17. Den testart som används i denna typ av studier är den sötvattenslevande oligochaeten *Lumbriculus variegatus* (Müller). Denna art tolererar ett brett spektrum av sedimenttyper, och används ofta för testning av sedimenttoxicitet och bioackumulering [t.ex. (3), (5), (7), (9), (13), (15), (16), (22), (23), (24), (25), (26), (27), (28), (29), (30), (31), (32), (33), (34), (35)]. Man bör rapportera försöksdjurens ursprung, bekräftelse av artidentiteten (t.ex. (36)) såväl som odlingsförhållandena. Det är inte nödvändigt att identifiera arten före varje test om organismerna härrör från en odling inom laboratoriet.

Odling av testorganismer

18. För att ha ett tillräckligt antal maskar för utförandet sedimenttoxicitetstester är det lämpligt att hålla maskarna i en permanent laboratorieodling. Vägledning om laboratorieodlingsmetoder för *Lumbriculus variegatus* och källor för startkulturer anges i tillägg 5. Närmare uppgifter om odling av denna art finns i hänvisningarna (3), (7), (27).

19. För att säkerställa att testerna utförs med djur av samma art rekommenderas starkt att man inrättar kulturer med en enda art. Se till att kulturerna och särskilt maskarna som används för testet inte har några synliga sjukdomar eller abnormaliteter.

Vatten

20. Rekonstituerat vatten enligt kapitel C.1 i denna bilaga (37) rekommenderas som överliggande vatten i testerna. Det kan även användas för laboratoriekulturerna med maskar (för beredning, se tillägg 2). Om så behövs kan naturligt vatten användas. Det valda vattnet ska vara av en kvalitet som möjliggör tillväxt och förökning av testarten under acklimatiserings- och testperioderna, utan att den uppvisar ett onormalt utseende eller beteende. *Lumbriculus variegatus* har visat sig överleva, växa och föröka sig i denna typ av vatten (30), och arten medger också maximal standardisering av test- och odlingsförhållandena. Om rekonstituerat vatten används bör dess sammansättning uppges, och vattnet ska beskrivas före användning med åtminstone uppgifter om pH, syrehalt och hårdhet (uttryckt i mg $CaCO_3$/l). En analys av vattnet för mikroföroreningar före användning kan ge värdefull information (se t.ex. tillägg 3).

21. pH i det överliggande vattnet bör vara 6,0–9,0 (se punkt 13). Om man förväntar sig en ökad utveckling av ammoniak anses det lämpligt att hålla pH-värdet mellan 6,0 och 8,0. För testning av t.ex. svaga organiska syror är det lämpligt att justera pH-värdet genom buffring av det vatten som används i testet, enligt beskrivning t.ex. av (16). Den totala hårdheten hos det vatten som används i testet bör vara 90–300 mg $CaCO_3$/liter för naturligt vatten. Tillägg 3 innehåller en sammanfattning av kompletterande kriterier för godtagbart utspädningsvatten enligt OECD:s riktlinje 210 (38).

▼M6

Sediment

22. Eftersom oförorenade naturliga sediment från en viss källa inte alltid finns att tillgå under hela året, och inhemska organismer och förekomsten av mikroföroreningar kan påverka testet, bör ett syntetiskt sediment (även kallat rekonstituerat eller konstgjort sediment) helst användas. Användning av syntetiskt sediment minimerar testbetingelsernas variabilitet samt införandet av inhemsk fauna. Följande syntetiska sediment bygger på det konstgjorda sedimentet i enlighet med (6), (39) och (40). Det rekommenderas för användning i denna typ av test ((6), (10), (30), (41), (42) och (43)):

(a) 4–5 % (torrvikt) vitmosstorv (*Sphagnum*). Det är viktigt att använda torv i pulverform; nedbrytningsgrad: ”medium”, finmald (partikelstorlek ≤ 0,5 mm), och uteslutande lufttorkad.

(b) 20 ± 1 % (torrvikt) kaolinlera (kaolinithalt helst över 30 %).

(c) 75–76 % (torrvikt) kvartssand (bestående av fin sand, kornstorlek: ≤ 2 mm, men > 50 % av partiklarna bör ha en storlek på 50–200 μm).

(d) Avjonat vatten, 30–50 % av sedimentets torrsubstans, utöver sedimentets torra beståndsdelar.

(e) Kemiskt ren kalciumkarbonat ($CaCO_3$) tillsätts för att justera den slutliga sedimentblandningens pH.

(f) Halten av organiskt kol (TOC) i den slutliga blandningen bör vara 2 % (± 0,5 %) torrvikt sediment och bör justeras med lämpliga mängder torv och sand enligt (a) och (c).

(g) Foder, till exempel pulvriserade blad av brännässla (*Urtica* sp., i enlighet med apoteksstandarder för livsmedel), eller en blandning av pulvriserade blad av *Urtica* sp. och alfacellulosa (1: 1) vid 0,4–0,5 % torrvikt sediment, utöver sedimentets torra beståndsdelar. För detaljer se tillägg 4.

23. Källorna till torv, kaolinlera, fodermaterial och sand ska vara kända. Utöver punkt g) anges i kapitel C.27 i denna bilaga (6) alternativa växtmaterial som kan användas som näringskälla: torkade mullbärsblad (*Morus alba*), vitklöver (*Trifolium repens*), spenat (*Spinacia oleracea*) eller sädesslag.

24. Den valda foderkällan bör tillsättas före eller under spikningen av sedimentet med testkemikalien. Den valda foderkällan bör möjliggöra åtminstone godtagbar reproduktion i kontrollerna. Analys av det syntetiska sedimentet eller dess beståndsdelar innan användning med avseende på mikroföroreningar kan ge användbar information. Ett exempel på hur det syntetiska sedimentet kan beredas beskrivs i tillägg 4. Det är också godtagbart att blanda torra beståndsdelar om det går att visa att det inte förekommer en uppdelning av sedimentets beståndsdelar efter tillsats av det överliggande vattnet (t.ex. flytande torvpartiklar) och att torven eller sedimentet konditionerats tillräckligt (se även punkt 25 och tillägg 4). För det syntetiska sedimentet bör minst anges beståndsdelarnas ursprung, kornstorleksfördelningen (procentandel sand, dy och lera), halten av organiskt kol (TOC), vattenhalt och pH. Mätningen av redoxpotentialen är valfri.

25. Om så krävs, t.ex. för specifika testningsändamål, kan naturliga sediment från oförorenade platser också användas som test- och/eller kultursediment (3). Om naturligt sediment används bör minst anges ursprung (insamlingsplats), pH och ammoniak i porvatten, halten av organiskt kol (TOC) och kväve, partikelstorleksfördelning (procentandel sand, dy och lera) och procentuell andel vatten (7), och sedimentet bör vara fritt från alla föroreningar

▼M6

och andra organismer som kan konkurrera med eller leva på testorganismerna. Mätningen av redoxpotentialen och katjonutbyteskapaciteten är valfri. Dessutom rekommenderas att det naturliga sedimentet, innan det spikas med testkemikalien, konditioneras i sju dagar under samma betingelser som råder i det efterföljande testet. I slutet av denna konditioneringsperiod bör det överliggande vattnet avlägsnas och kasseras.

26. Sediment som ska användas måste hålla en kvalitet som möjliggör kontrollorganismernas överlevnad och reproduktion under hela exponeringsperioden utan att de uppvisar ett onormalt utseende eller beteende. Kontrollmaskarna bör gräva sig igenom sedimentet, och de bör förtära sedimentet. Reproduktionen i kontrollerna bör åtminstone överensstämma med giltighetskriteriet i enlighet med punkt 13. Förekomsten eller frånvaron av fekala pelletar på sedimentytan, vilket är ett tecken på om maskarna förtär sedimentet eller inte, bör registreras och kan vara till hjälp för att tolka testresultaten med avseende på exponeringsvägar. Ytterligare information om sedimentförtäring kan erhållas med hjälp av metoder som beskrivs i (24), (25), (44) och (45), som i detalj anger testorganismernas sedimentintag och partikelurval.

27. De förfaranden som används för hantering av naturliga sediment innan de används i laboratoriet beskrivs i (3), (7) och (12). Beredningen och lagringen av det syntetiska sediment som rekommenderas för användning i *Lumbriculus*-testet beskrivs i tillägg 4.

Applicering av testkemikalien

28. Sedimentet ska spikas med testkemikalien. Eftersom de flesta testkemikalier förväntas ha låg vattenlöslighet bör de lösas upp i ett lämpligt organiskt lösningsmedel (t.ex. aceton, n-hexan, cyklohexan) i en så liten volym som möjligt för beredning av stamlösningen. Stamlösningen ska spädas med samma lösningsmedel som används för beredning av testlösningarna. Lösningsmedlets toxicitet och flyktighet samt testkemikaliens löslighet i det valda lösningsmedlet bör vara de huvudsakliga kriterier som används vid valet av lämpligt solubiliseringsmedel. För varje koncentrationsnivå bör samma volym av motsvarande lösning användas. Sedimentet ska spikas i bulk för varje koncentrationsnivå för att minimera variabiliteten i testkemikaliens koncentration mellan replikaten. Var och en av dessa testlösningar blandas därefter med kvartssand på det sätt som beskrivs i punkt 22 (t.ex. 10 g kvartssand per testkärl). För att genomdränka kvartssanden helt har en volym på 0,20–0,25 ml per gram sand befunnits räcka. Därefter ska lösningsmedlet avdunsta till torrhet. För att minimera förlusterna av testkemikalien genom samtidig avdunstning (t.ex. beroende på kemikaliens ångtryck) används den belagda sanden omedelbart efter torkning. Den torra sanden blandas med en lämplig mängd syntetiskt sediment med motsvarande koncentrationsnivå. Mängden sand som tillhandahålls av testkemikalie-och-sandblandningen måste beaktas när man bereder sedimentet (dvs. sedimentet ska sålunda beredas med mindre mängd sand). En viktig fördel med detta förfarande är att så gott som inget lösningsmedel tillsätts i sedimentet (7). Alternativt, t.ex. för fältsediment, kan testkemikalien tillsättas genom att spika en torkad och finfördelad del av sedimentet på det sätt som beskrivs ovan för kvartssanden, eller genom att blanda ner testkemikalien i det våta sedimentet och därefter avdunsta det eventuella solubiliseringsmedel som använts. Man bör vara noga med att se till att testkemikalien som tillsätts sedimentet fördelas omsorgsfullt och jämnt i sedimentet. Vid behov kan delprover analyseras för att bekräfta målkoncentrationerna i sedimentet, och för att bestämma homogenitetsgraden. Det kan också vara lämpligt att analysera delprover av testlösningarna för att bekräfta målkoncentrationerna i sedimentet. Eftersom ett lösningsmedel används för att belägga kvartssanden med testkemikalien bör en lösningsmedelskontroll användas som bereds med samma mängd lösningsmedel som testsedimentet. Metoden för spikning

▼M6

och motiveringen av valet av ett visst spikningsförfarande annat än de som beskrivs ovan bör rapporteras. Metoden för spikning kan anpassas till testkemikaliens fysikalisk-kemiska egenskaper, t.ex. för att undvika förluster på grund av avdunstning under spikningen eller stabiliseringsförloppet. Ytterligare vägledning om spikningsförfaranden finns i Environment Canada (1995) (46).

29. Efter det att det spikade sedimentet har beretts, fördelats i replikattestkärlen och fyllts på med testvatten är det önskvärt att testkemikalien ska kunna fördelas från sedimentet till vattenfasen (t.ex. (3) (7) (9)). Detta bör helst göras under samma temperatur- och luftningsförhållanden som används i testet. Stabiliseringstiden beror på sedimentet och kemikalien, och kan variera mellan några timmar och flera dagar, i sällsynta fall upp till flera veckor (4–5 veckor) (t.ex. (27)(47)). I detta test väntar man inte på att jämvikt ska uppnås, men det rekommenderas att man har en stabiliseringstid på mellan 48 timmar och 7 dagar. På så sätt minimeras tiden för nedbrytning av testkemikalien. Beroende på syftet med studien, t.ex. om man ska efterlikna vissa miljöförhållanden, kan det spikade sedimentet stabiliseras eller åldras under en längre period.

30. I slutet av denna stabiliseringsperiod bör prover tas åtminstone av det överliggande vattnet och bulksedimentet, minst vid den högsta koncentrationen och en lägre koncentration, för analys av testkemikaliens koncentration. Dessa analytiska bestämningar av testkemikalien gör det möjligt att beräkna massbalansen och uttrycka resultaten på grundval av uppmätta startkoncentrationer. I allmänhet stör eller förstör provtagningen sedimentets vattensystem. Därför är det ofta omöjligt att använda samma replikat för provtagning av sediment och maskar. Ytterligare ”analyskärl” av lämpliga dimensioner måste inrättas som behandlas på samma sätt (inklusive förekomsten av testorganismer) men som inte används för biologiska observationer. Kärlens dimensioner bör väljas ut för att ge prov av de mängder som krävs enligt analysmetoden. Detaljer rörande provtagningen beskrivs i punkt 53.

TESTFÖRFARANDE

Preliminärt test

31. Om ingen information finns tillgänglig om testkemikaliens toxicitet för *Lumbriculus variegatus* kan det vara lämpligt att göra ett preliminärt test för att fastställa koncentrationerna som ska testas vid det definitiva testet och för att optimera provningsförhållandena för det definitiva testet. För detta ändamål används en serie med vitt spridda koncentrationer av testkemikalien. Maskarna exponeras för varje koncentration av testkemikalien under en period (t.ex. 28 dagar som vid det definitiva testet) som möjliggör uppskattning av lämpliga testkoncentrationer. Inga replikat behövs. Den aspekt av maskarnas beteende, t.ex. undvikande av sedimentet, som kan ha orsakats av testkemikalien och/eller sedimentet bör observeras och noteras under det preliminära testet. Koncentrationer som överstiger 1 000 mg/kg torrvikt sediment bör inte testas i det preliminära testet.

Definitivt test

32. Vid det definitiva testet används minst fem koncentrationer som väljs ut t.ex. på grundval av resultatet av det preliminära testet (punkt 31), och på det sätt som beskrivs i punkterna 35, 36, 37 och 38.

▼M6

33. Utöver själva testserierna bör man ha en kontroll (för replikation se punkterna 36, 37 och 38) som innehåller alla beståndsdelar utom testkemikalien. Om solubiliseringsmedel används för applicering av testkemikalien bör detta inte ha någon betydande effekt på testorganismerna, något som uppdagas i en ytterligare kontroll med enbart lösningsmedel.

Testupplägg

34. Testupplägget avser antalet koncentrationer och intervallen mellan dem, antalet kärl per koncentration och antalet tillsatta maskar per kärl. Testutformningar för bestämning av EC_x, för uppskattning av NOEC och för utförande av toleranstest beskrivs i punkterna 35, 36, 37 och 38.

35. Effektkoncentrationen (t.ex. EC_{50}, EC_{25}, EC_{10}) och det koncentrationsintervall som är relevant för testkemikalien bör omges av de koncentrationer som ingår i testet. Man bör undvika att extrapolera långt under den lägsta koncentration som påverkar testorganismerna eller över den högsta koncentration som testas. Om en sådan extrapolering – i undantagsfall – sker måste en fullständig förklaring ges i rapporten.

36. Om man ska uppskatta EC_x bör minst fem koncentrationer och minst tre replikat för varje koncentration testas. Sex replikat rekommenderas för kontrollen eller – i förekommande fall – lösningsmedelskontrollen för att förbättra uppskattningen av variabiliteten i kontrollen. Det är under alla omständigheter tillrådligt att använda tillräckligt många testkoncentrationer för att få en god modelluppskattning. Faktorn mellan koncentrationerna bör inte vara större än två (undantag kan göras i fall där dos-respons-kurvan har liten lutning). Antalet replikat per testkärl kan minskas om antalet testkoncentrationer med responser inom intervallet 5–95 % ökar. En ökning av antalet replikat eller en minskning av testkoncentrationsintervallerna tenderar att leda till smalare konfidensintervaller för testet.

37. Om LOEC eller NOEC ska uppskattas bör minst fem testkoncentrationer med minst fyra replikat (sex replikat rekommenderas för kontrollen eller – i förekommande fall – lösningsmedelskontrollen för att förbättra uppskattningen av variabiliteten i kontrollen) användas och faktorn mellan koncentrationerna bör inte vara större än två. Vissa uppgifter om den statistiska styrka som konstaterats under hypotesprövningen i ringtestet för testmetoden finns i tillägg 6.

38. Ett toleranstest kan utföras (med en testkoncentration och kontroller) om inga effekter förväntas upp till 1 000 mg/kg torrvikt sediment (t.ex. utifrån ett preliminärt test), eller om ett test vid en enda koncentration är tillräckligt för att bekräfta ett NOEC-värde som är av intresse. I det senare fallet ska en detaljerad motivering för valet av koncentrationsgräns ingå i testrapporten. Syftet med toleranstestet är att genomföra ett test vid en koncentration som är tillräckligt hög för att beslutsfattare ska kunna utesluta att kemikalien eventuellt har toxiska effekter, och gränsen sätts vid en koncentration som inte förväntas förekomma i någon situation. 1 000 mg/kg (torrvikt) rekommenderas. Normalt är det nödvändigt att ha minst sex replikat både för test och kontroll. Vissa uppgifter om den statistiska styrka som konstaterats under hypotesprövningen i ringtestet för testmetoden finns i tillägg 6.

Exponeringsförhållanden

Testorganismer

39. Testet ska utföras med minst tio maskar i varje replikat som används för bestämning av de biologiska parametrarna. Detta antal maskar motsvarar ungefär 50–100 mg våt biomassa. Om man antar att torrinnehållet är 17,1 %

▼M6

(48) leder detta till omkring 9–17 mg torr biomassa per kärl. Den amerikanska miljöskyddsmyndigheten (EPA) (2000 (7)) rekommenderar att djurtätheten inte överskrider 1:50 (torr biomassa: totalt innehåll av organiskt kol (TOC)). För det syntetiska sediment som beskrivs i punkt 22 motsvarar detta ungefär 43 g sediment (torrvikt) per tio maskar vid ett TOC på 2,0 % för torrt sediment. Om fler än tio maskar används per kärl bör mängderna sediment och överliggande vatten anpassas i enlighet med detta.

40. Testmaskarna bör komma från samma källa och vara djur som befinner sig i liknande fysiologiska stadier (se tillägg 5). Man bör välja maskar i liknande storlekar (se punkt 39). Det rekommenderas att ett delprov av partiet eller beståndet av maskar vägs före testet i syfte att uppskatta medelvikten.

41. Maskar som ska användas i ett test tas bort ur odlingen (för detaljer, se tillägg 5). Stora (adulta) djur som inte visar tecken på att nyligen ha delats överförs till glaskärl (t.ex. petriskålar) med rent vatten. De synkroniseras senare på det sätt som beskrivs i tillägg 5. Efter regenerering under 10–14 dagar bör intakta hela maskar av liknande storlek som aktivt simmar eller kryper efter lätt mekanisk retning användas för testet. Om testbetingelserna avviker från odlingsbetingelserna (t.ex. i fråga om temperatur, ljusförhållanden, och överliggande vatten), bör det räcka med en acklimatiseringsfas på t.ex. 24 timmar vid samma temperatur, ljusförhållanden och överliggande vatten som i testet för att maskarna ska anpassa sig till testbetingelserna. De anpassade oligochaeterna bör fördelas slumpmässigt i provkärlen.

Utfodring

42. Eftersom foder tillsätts i sedimentet före (eller under) applicering av testkemikalien utfodras maskarna inte under testet.

Ljus och temperatur

43. Fotoperioden i kulturen och testet är normalt 16 timmar (3), (7). Ljusintensiteten bör vara låg (t.ex. 100–500 lux) för att imitera de naturliga förhållandena vid sedimentytan, och bör mätas minst en gång under exponeringstiden. Temperaturen ska vara 20 ± 2 °C under hela testet. På en bestämd mätningsdag bör temperaturskillnaden mellan testkärlen inte överstiga ± 1 °C. Testkärlen bör placeras slumpmässigt i testinkubatorn eller i testområdet, t.ex. för att minimera systematiska avvikelser i reproduktionen på grund av kärlens placering.

Luftning

44. Det överliggande vattnet i testkärlen bör luftas försiktigt (t.ex. 2–4 bubblor per sekund) genom en pasteurpipett som placeras ca 2 cm ovanför sedimentytan för att minimera grumling av sedimentet. Man bör vara noga med att halten löst syre inte faller under 30 % av luftmättnadsvärdet (ASV). Lufttillförseln bör kontrolleras och vid behov justeras minst en gång per dag under vardagarna.

Mätning av vattenkvalitet

45. Följande parametrar för vattenkvalitet bör mätas i det överliggande vattnet:

Temperatur:	i minst ett testkärl för varje koncentrationsnivå och ett testkärl av kontrollerna en gång per vecka och i början och slutet av exponeringsperioden. Om möjligt kan även temperaturen i det omgivande mediet (den omgivande luften eller vattenbadet) registreras t.ex. en gång per timme.

▼M6

Halten löst syre:	i minst ett testkärl för varje koncentrationsnivå och ett testkärl av kontrollerna en gång per vecka och i början och slutet av exponeringsperioden. Detta ska uttryckas i mg/l och % ASV (luftmättnadsvärde).
Lufttillförsel:	bör kontrolleras minst en gång dagligen på vardagar och justeras vid behov.
pH-värde:	i minst ett testkärl för varje koncentrationsnivå och ett testkärl av kontrollerna en gång per vecka och i början och slutet av exponeringsperioden.
Total vattenhårdhet:	i minst ett kontrollreplikat och ett testkärl vid den högsta koncentrationen i början och slutet av exponeringsperioden. Detta ska uttryckas i mg/l $CaCO_3$.
Total ammoniakhalt:	i minst ett kontrollreplikat och ett testkärl för varje koncentrationsnivå i början av exponeringstiden, och därefter tre gånger per vecka. Detta uttrycks i mg/l NH_4^+ eller NH_3 eller total mängd ammoniak-N.

Om mätningen av parametrarna för vattenkvalitet innebär att betydande mängder vatten måste avlägsnas från kärlen kan det vara tillrådligt att inrätta separata kärl för mätningar av vattenkvalitet så att man undviker att rubba förhållandet mellan vattenvolymen och sedimentvolymen.

Biologiska observationer

46. Under exponeringen bör testkärlen granskas visuellt för att bedöma eventuella skillnader i maskarnas beteende (t.ex. undvikande av sedimentet, fekala pelletar synliga på sedimentytan) jämfört med kontrollerna. Dessa observationer ska registreras.

47. Vid slutet av testet undersöks varje replikat (ytterligare kärl som används för kemiska analyser kan undantas från undersökningen). En lämplig metod ska användas för att avlägsna alla maskar från testkärlet. Det är viktigt att se till att alla maskar avlägsnas utan att skadas. En möjlig metod är siktning av maskarna från sedimentet. Ett nät av rostfritt stål med lämplig maskstorlek kan användas. Det mesta av det överliggande vattnet hälls försiktigt av och det återstående sedimentet och vattnet omröres så att man får en sörja som kan passeras genom sikten. Om man använder ett nät vars maskor är 500 μm kommer de flesta av sedimentpartiklarna att snabbt passera igenom, men siktningen bör göras snabbt för att undvika att maskar kryper in i eller genom nätet. Om man använder ett nät på 250 μm hindrar man maskarna från att krypa in i eller genom nätet, men man bör vara noga med att se till att så få sedimentpartiklar som möjligt blir kvar i nätet. Den siktade sörjan i varje replikatkärl kan passeras genom sikten en andra gång för att se till att alla maskar avlägsnas. En alternativ metod är att man värmer sedimentet genom att placera testkärlen i ett vattenbad med en temperatur på 50–60 °C. Maskarna kryper då upp ur sedimentet och kan samlas upp på ytan med hjälp av en flampolerad pipett med bred spets. Ett annat alternativ är att man framställer en sedimentsörja och häller denna i en grund skål av lämplig storlek. Från det tunna skiktet av sörjan kan maskarna plockas upp med en nål av stål eller en pincett (som används mer som en gaffel än en pincett för att undvika att skada maskarna) och överföras till rent vatten. Efter att maskarna har separerats från sedimentsörjan ska de sköljas i testmediet och räknas.

48. Oberoende av vilken metod som används bör laboratorierna kunna visa att deras personal kan avlägsna i genomsnitt minst 90 % av testorganismerna

▼M6

från sedimentet. Till exempel kan ett visst antal testorganismer tillsättas kontroll- eller testsediment och andelen avlägsnade maskar kan fastställas efter 1 timme (7).

49. Det totala antalet levande och döda individer per replikat bör registreras och utvärderas. Följande grupper av maskar anses vara döda:

a) maskar som inte reagerar på lätt mekanisk retning

b) maskar som visar tecken på förruttnelse (i kombination med a))

c) maskar som saknas

Dessutom kan de levande maskarna hänföras till en av tre grupper:

a) stora, hela maskar (adulter) utan återbildade kroppspartier

b) hela maskar med återbildade kroppspartier med ljusare färg (dvs. med nya bakre delar, med nya främre delar, eller med både nya bakre och främre delar)

c) ofullständiga maskar (dvs. maskar som nyligen delats med kroppspartier som inte återbildats)

Dessa ytterligare överväganden är inte obligatoriska, men kan användas för utökad tolkning av de biologiska resultaten (t.ex. ett stort antal maskar i grupp c) kan tyda på en försening av reproduktionen eller återbildandet i en viss testgrupp). Om man upptäcker skillnader i utseendet (t.ex. skador på integumentet, ödematösa kroppspartier) mellan testmaskar och kontrollmaskar bör dessa registreras.

50. Omedelbart efter räkningen/bedömningen ska de levande maskarna i varje replikat överföras till torra, tidigare vägda och märkta vågskålar (en per replikat) och avlivas med en droppe etanol per vågskål. Vågskålarna placeras i ett torkskåp med en temperatur på 100 ± 5 °C och får torka över natten, varefter de vägs efter att de har svalnat i en exsickator och torrvikten maskar fastställs (helst i gram, med minst fyra decimaler).

51. Utöver den totala torrvikten kan man fastställa den askfria torrvikten enligt beskrivningen i (49) för att redovisa oorganiska komponenter som härrör från förtärt sediment som förekommer i maskarnas matsmältningsorgan.

52. Biomassan fastställs som biomassa totalt per replikat inklusive adulter och juveniler. Döda maskar bör inte beaktas vid fastställandet av biomassa per replikat.

Kontroll av koncentrationer av testkemikalien

Provtagning

53. Prover för kemisk analys av testkemikalien bör tas åtminstone för den högsta koncentrationen och en lägre koncentration, samt åtminstone i slutet av stabiliseringsfasen (före tillsats av testorganismerna) och i slutet av testet. Prover bör tas åtminstone av bulksedimentet och det överliggande vattnet för analys. Minst två prover bör tas per matris och behandling för varje provtagningsdag. Ett av duplikatproverna får lagras som reserv (för att analyseras t.ex. om den inledande analysen faller utanför det ± 20-procentiga intervallet för den nominella koncentrationen). När det gäller särskilda

▼M6

kemiska egenskaper, t.ex. om man förväntar sig en snabb nedbrytning av testkemikalien, kan den analytiska tidsplanen vidareutvecklas (t.ex. ökad provtagningsfrekvens, analys av flera koncentrationsnivåer) på grundval av en expertbedömning. Prover kan sedan tas på mellanliggande provtagningsdagar (t.ex. på dag sju efter exponeringens början).

54. Prover på det överliggande vattnet bör tas genom att det noggrant hälls av eller tappas av genom en hävert för att minimera grumlingen av sedimentet. Provens volymer ska registreras.

55. Efter att det överliggande vattnet har avlägsnats bör sedimentet homogeniseras och överföras till en lämplig behållare. Vikten för det våta sedimentprovet registreras.

56. Om det även måste göras en analys av testkemikalien i porvattnet centrifugeras de homogeniserade och vägda sedimentproverna så att porvattnet erhålls. Cirka 200 ml vått sediment kan till exempel överföras till 250 ml centrifugeringsbägare. Därefter centrifugerar man proverna utan filtrering för att isolera porvattnet, t.ex. vid 10 000 ± 600 × *g* i 30–60 min vid en temperatur som inte överstiger testtemperaturen. Efter centrifugeringen hälls eller pipetteras supernatanten av. Man bör då se till att inga sedimentpartiklar tillförs, och att volymen registreras. Den återstående sedimentpelletens vikt registreras. Det kan underlätta uppskattningen av massbalansen eller utbytet av testkemikalien i vatten/sediment-systemet om sedimentets torrvikt bestäms för varje provtagningsdag. I vissa fall är det kanske inte möjligt att analysera koncentrationerna i porvattnet på grund av att provet är för litet.

57. Om analysen inte görs omedelbart ska alla prover förvaras på lämpligt sätt, exempelvis under de lagringsförhållanden som rekommenderas för minsta möjliga nedbrytning av testkemikalien i fråga (miljöprover lagras t.ex. vanligtvis i mörker vid – 18 °C). Ta reda på de korrekta lagringsförhållandena för testkemikalien – t.ex. varaktighet och förvaringstemperatur, extraktionsmetoder osv. – innan studien inleds.

Analysmetod

58. Eftersom hela proceduren i huvudsak styrs av den noggrannhet, precision och känslighet som analysmetoden för testkemikalien har ska man kontrollera experimentellt att precisionen och reproducerbarheten för den kemiska analysen, såväl som utbytet av testkemikalien från vatten- och sedimentproverna, är tillfredsställande för den aktuella metoden, åtminstone vid de högsta och lägsta testkoncentrationerna. Dessutom bör man kontrollera att testkemikalien inte kan påvisas i kontrollkamrarna i koncentrationer som är högre än bestämningsgränsen. Korrigera vid behov de nominella koncentrationerna för utbytet från kvalitetskontrolltopparna (t.ex. när utbytet ligger utanför 80–120 % av den spikade mängden). Hantera alla prover under hela testet på ett sådant sätt att förorening och förlust minimeras (t.ex. till följd av att testkemikalien adsorberas på provtagningsutrustningen).

59. Utbytet av testkemikalien, bestämningsgränsen och detektionsgränsen i sedimentet och vattnet bör registreras och rapporteras.

DATA OCH RAPPORTERING

Behandling av resultaten

60. De viktigaste av testets obligatoriska responsvariabler som ska utvärderas statistiskt är biomassan och det totala antalet maskar per replikat. Alternativt kan reproduktionen (ökningen av antalet maskar) och tillväxten (ökningen av den torra biomassan) också utvärderas. I så fall ska en uppskattning av maskarnas torrvikt i början av exponeringen göras, t.ex. genom att man fastställer torrvikten av ett representativt delprov av det parti med synkroniserade maskar som ska användas i testet.

▼M6

61. Även om dödlighet är inte en endpoint i detta test bör dödligheten utvärderas så långt det är möjligt. När dödligheten uppskattas ska antalet maskar som inte reagerar på lätt mekanisk retning eller visar tecken på förruttnelse samt de maskar som saknas anses vara döda. Dödligheten bör som minst registreras och beaktas vid tolkningen av testresultaten.

62. Effektkoncentrationerna uttrycks i mg/kg torrvikt sediment. Om det utbyte av testkemikalien som uppmätts i sedimentet, eller i sedimentet och det överliggande vattnet i början av exponeringen, motsvarar mellan 80 och 120 % av de nominella koncentrationerna kan effektkoncentrationerna (EC_x, NOEC, LOEC) uttryckas utifrån de nominella koncentrationerna. Om utbytet avviker från de nominella koncentrationerna med mer än ± 20 % av de nominella koncentrationerna bör effektkoncentrationerna (EC_x, NOEC, LOEC) baseras på de ursprungligen uppmätta koncentrationerna vid början av exponeringen, t.ex. genom att man tar hänsyn till massbalansen för testkemikalien i testsystemet (se punkt 30). I dessa fall kan ytterligare information erhållas från en analys av stam- och/eller appliceringslösningarna för att bekräfta att testsedimentet bereddes på ett korrekt sätt.

EC_x

63. EC_x-värden för de parametrar som beskrivs i punkt 60 beräknas med hjälp av lämpliga statistiska metoder (t.ex. probit-analys, logistiska funktioner eller Weibull-funktioner, den modifierade Spearman-Karbermetoden eller enkel interpolering). Riktlinjer för statistisk utvärdering finns i (15) och (50). EC_x beräknas genom att ett värde som motsvarar x % av medelvärdet för kontrollen införs i den ekvation som erhållits. För att beräkna EC_{50} eller något annat EC_x-värde bör en regressionsanalys utföras på medelvärdena för varje testkärl ($\overline{X}$).

NOEC/LOEC

64. Om en statistisk analys används för att bestämma NOEC/LOEC är det nödvändigt att sammanställa statistiska uppgifter för varje enskilt kärl (enskilda kärl anses utgöra replikat). Lämpliga statistiska metoder ska användas. I allmänhet ska negativa effekter av testämnet jämfört med kontrollen undersökas genom en ensidig (mindre) hypotesprövning vid $p \leq 0,05$. Exempel ges i de följande punkterna. Vägledning rörande val av lämpliga statistiska metoder ges i (15) och (50).

65. Normalfördelningen av data kan kontrolleras t.ex. med Kolmogorov-Smirnovs test av anpassningsgraden, kvoten mellan variationsvidden och standardavvikelsen (R/s-testet) eller Shapiro-Wilks test (dubbelsidigt, $p \leq 0,05$). Cochrans test, Levenes test eller Bartletts test (dubbelsidigt, $p \leq 0,05$) kan användas för att testa varianshomogeniteten. Om förutsättningarna för parametriska testförfaranden (normalitet, varianshomogenitet) är uppfyllda, kan ensidiga variansanalyser (ANOVA) och därpå följande flerjämförelsetester utföras. Parvisa jämförelser (t.ex. Dunnetts t-test) eller step-down-grundade trendtester (t.ex. Williams test) kan användas för att beräkna om det finns betydande skillnader ($p \leq 0,05$) mellan kontrollerna och de olika testämneskoncentrationerna. I annat fall bör icke-parametriska metoder (t.ex. Bonferronis U-test enligt Holm eller Jonckheere-Terpstras trendtest) användas för att bestämma NOEC och LOEC.

Toleranstest

66. Om ett toleranstest (jämförelse av endast ett testkärl och en kontroll) har utförts och de nödvändiga förutsättningarna för parametriska testförfaranden (normalitet, homogenitet) är uppfyllda, kan metriska responser (maskarnas totala antal och biomassan som maskarnas torrvikt) utvärderas genom Students test (t-test). Om dessa krav inte uppfylls kan man använda t-testet med olika varians (Welchs t-test) eller ett icke-parametriskt test, såsom Mann-Whitneys U-test. En del information om den statistiska styrka som konstaterats under hypotesprövningen i ringtestet för metoden finns i tillägg 6.

▼M6

67. För att se om det finns betydande skillnader mellan kontrollerna (kontroll och kontroll med lösningsmedel), kan replikaten för varje kontroll testas enligt beskrivningen för toleranstestet. Om man inte upptäcker betydande skillnader med dessa tester kan alla kontroll- och lösningsmedelskontroll-replikat sammanföras. I annat fall bör alla testkärl jämföras med lösningsmedelskontrollen.

Tolkning av resultaten

68. Resultaten bör tolkas med försiktighet om det föreligger avvikelser från denna testmetod, och om de uppmätta koncentrationerna av testkoncentrationer befinner sig på nivåer som ligger nära den använda analysmetodens detektionsgräns. Alla avvikelser från denna metod ska noteras.

Testrapport

69. Testrapporten ska innehålla åtminstone följande information:

— *Testkemikalie:*

— kemiska identifieringsdata (trivialnamn, kemiskt namn, strukturformel, CAS-nummer osv.) samt renhet och analysmetod för kvantifiering av testkemikalien; dessutom källan till testkemikalien samt namn på och koncentration av de lösningsmedel som eventuellt använts,

— all tillgänglig information om fysikalisk form och fysikalisk-kemiska egenskaper som erhållits före testets början, (t.ex. vattenlöslighet, ångtryck, fördelningskoefficient i jord (eller i sediment, om denna information finns tillgänglig), log K_{ow}, stabilitet i vatten osv.).

— *Testade arter:*

— vetenskapligt namn, källa, eventuell förbehandling, acklimatisering, odlingsförhållanden etc.

— *Testbetingelser:*

— tillämpat testförfarande (t.ex. statiskt, semistatiskt eller genomflöde),

— testupplägg, t.ex. testkamrarnas antal och storlek, vattenvolymen per kärl, sedimentets vikt och volym per kärl, (för genomflöde eller semistatiskt förfarande: vattenväxlingshastigheten), eventuell luftning före och under testet, antalet replikat, antalet maskar per replikat, antalet testkoncentrationer, konditioneringstidens längd, stabiliserings- och exponeringstiden samt provtagningsfrekvensen,

— sedimentets och det överliggande vattnets djup,

— förbehandlings- och spiknings-/appliceringsmetod för testkemikalien,

— de nominella testkoncentrationerna, uppgifter om provtagning för kemisk analys och de analytiska metoder med vilka koncentrationerna av testkemikalien bestämdes,

— sedimentets egenskaper enligt beskrivning i punkterna 24–25, och eventuella andra gjorda mätningar samt beredningen av syntetiskt sediment,

— beredningen av testvattnet (om rekonstituerat vatten används) och dess egenskaper (syrehalt, pH, konduktivitet, hårdhet och alla andra utförda mätningar) innan testets början,

— detaljerad information om utfodringen, inklusive typ av foder, beredning, mängd och utfodringsprogram,

▼M6

— ljusintensitet och fotoperiod(er),

— de metoder som använts för bestämning av alla biologiska parametrar (t.ex. provtagning, inspektion, vägning av testorganismer) och abiotiska faktorer (t.ex. kvalitetsparametrar för vatten och sediment),

— volymen och/eller vikten av alla prover för kemisk analys,

— detaljerad information om behandlingen av alla prover för kemisk analys, inbegripet detaljer om beredning, lagring, spikningsförfaranden, extraktion och analytiska förfaranden (inklusive precision) för testkemikalien och utbyte av testkemikalien.

— *Resultat:*

— vattenkvaliteten i testkärlen (pH, temperatur, halten löst syre, hårdhet, ammoniakkoncentrationerna och alla andra utförda mätningar),

— halten av organiskt kol (TOC), förhållandet mellan torrvikt och våtvikt, pH i sedimentet, och eventuella andra gjorda mätningar,

— det totala antalet maskar och, om detta fastställts, antalet hela och ofullständiga maskar i varje testkammare vid testets slut,

— maskarnas torrvikt i varje testkammare vid testets slut och, om detta har uppmätts, torrvikten av ett delprov av maskarna vid testets början,

— allt onormalt beteende som observerats i jämförelse med kontrollerna (t.ex. undvikande av sedimentet, närvaro eller frånvaro av fekala pelletar),

— all observerad dödlighet,

— uppskattningar av toxiska endpoints (t.ex. EC_x, NOEC och/eller LOEC), och de statistiska metoder som använts för bestämningen av dem,

— de nominella testkoncentrationerna, de uppmätta testkoncentrationerna och resultaten av alla analyser som gjorts för att bestämma koncentrationen av testkemikalien i testkärlen,

— eventuella avvikelser från giltighetskriterierna.

— *Utvärdering av resultaten:*

— resultatens överensstämmelse med giltighetskriterierna enligt förteckningen i punkt 13,

— diskussion av resultaten, inbegripet eventuell inverkan på testresultatet som kan tillskrivas avvikelser från denna testmetod.

LITTERATUR

(1) Europeiska kommissionen (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, del I–IV. Byrån för Europeiska gemenskapernas officiella publikationer, Luxemburg.

(2) OECD (1992a). Report of the OECD workshop on effects assessment of chemicals in sediment. OECD Monographs nr 60. Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling (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. I ASTM International 2004 Annual Book of Standards. Vol. 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. Vol. 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.

(5) Phipps, G. L., Ankley, G. T., Benoit, D. A. och Mattson, V. R. (1994). 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 denna bilaga: Toxicitetstest i sediment- och vattenfas på chironomidlarver med spikat sediment.

(7) U.S. EPA (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Andra upplagan. EPA 600/R-99/064, U.S. Environmental Protection Agency, Duluth, MN, March 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) Hill, I. R., Matthiessen, P. och Heimbach, F. (red.), 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. Redaktörer: M. Streloke och H.Köpp. Berlin 1995.

(11) Riedhammer, C. och 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) Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H. J. och Gilberg, D. (2005). Validation of a sediment toxicity test with the endobenthic aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus* by an international ring test. I samarbete med R. Nagel och B. Karaoglan. Rapport till den federala tyska miljöskyddsmyndigheten (Umweltbundesamt, Berlin), R&D nr: 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, femte utkastet, mars 2003, Report EPS 1/RM/

(16) Nikkilä A., Halme A. och Kukkonen J. V. K. (2003). Toxicokinetics, toxicity and lethal body residues of two chlorophenols in the oligochaete worm, *Lumbriculus variegatus*, in different sediments. Chemosphere 51: 35–46.

(17) Baily, H. C. och Liu, D. H. W. (1980). *Lumbriculus variegatus*, a Benthic Oligochaete, as a Bioassay Organism, s. 205–215. I J. C. Eaton, P. R. Parrish och A. C. Hendricks (red.). Aquatic Toxicology, ASTM STP 707. American Society for Testing and Materials.

▼M6

(18) Chapman, K. K., Benton, M. J., Brinkhurst, R. O. och Scheuerman P. R. (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) Meyer, J. S., Boese, C. J. och Collyard, S. A. (2002). Whole-body accumulation of copper predicts acute toxicity to an aquatic oligochaete (*Lumbriculus variegatus*) as pH and calcium are varied. Comp. Biochem. Physiol. Del C 133:99–109.

(20) Schubauer-Berigan, M. K., Dierkes, J. R., Monson, P. D. och Ankley, G. T. (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) West, C. W., V. R. Mattson, E. N. Leonard, G. L. Phipps och 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) Ingersoll, C. G., Ankley, G. T., Benoit D. A., Brunson, E. L., Burton, G. A., Dwyer, F. J., Hoke, R. A., Landrum, P. F., Norberg-King, T. J. och Winger, P. V. (1996). Toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants using freshwater invertebrates: A review of methods and applications. Environ. Toxicol. Chem. 14, 1885–1894.

(23) Kukkonen, J. och Landrum, P. F. (1994). Toxicokinetics and toxicity of sediment-associated Pyrene to *Lumbriculus variegatus* (Oligochaeta). Environ. Toxicol. Chem. 13, 1457–1468.

(24) Leppänen, M. T. och Kukkonen, J. V. K. (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) Leppänen, M. T. och Kukkonen, J. V. K. (1998b). Factors affecting feeding rate, reproduction and growth of an oligochaete *Lumbriculus variegatus* (Müller). Hydrobiologia 377, 183–194.

(26) Landrum, P. F., Gedeon, M. L., Burton, G. A., Greenberg, M. S. och Rowland, C. D. (2002). Biological Responses of *Lumbriculus variegatus* Exposed to Fluoranthene-Spiked Sediment. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 42: 292–302.

(27) Brunson, E. L., Canfield, T. J., Ingersoll, C. J. och Kemble, N. E. (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) Ingersoll, C. G., Brunson, E. L., Wang, N., Dwyer, F. J., Ankley, G. T., Mount, D. R., Huckins, J., Petty, J. och Landrum, P. F. (2003). Uptake and depuration of non-ionic organic contaminants from sediment by the oligochaete, *Lumbriculus variegatus*. Environmental Toxicology and Chemistry 22, 872–885.

(29) Rodriguez, P. och Reynoldson, T. B. (1999). Laboratory methods and criteria for sediment bioassessment. I: A. Mudroch, J. M. Azcue och P. Mudroch (red.): Manual of Bioassessment of aquatic sediment quality. Lewis Publishers, Boca Raton, CRC Press LLC.

(30) Liebig, M., Egeler, Ph., Oehlmann, J. och Knacker, Th. (2005). Bioaccumulation of ^{14}C-17α-ethinylestradiol by the oligochaete *Lumbriculus variegatus* in artificial sediment. Chemosphere 59, 271–280.

(31) Brust, K., O. Licht, V. Hultsch, D. Jungmann och R. Nagel (2001). Effects of Terbutryn on Aufwuchs and *Lumbriculus variegatus* in Artificial Indoor Streams. Environ. Toxicol. Chemistry, vol. 20, s. 2000–2007.

(32) Oetken, M., K.-U. Ludwichowski och R. Nagel (2000). Sediment tests with *Lumbriculus variegatus* and *Chironomus riparius* and 3,4-dichloroaniline (3,4-DCA) within the scope of EG-AltstoffV. På uppdrag av den federala tyska miljöskyddsmyndigheten (Umweltbundesamt, Berlin), FKZ 360 12 001, mars 2000.

▼M6

(33) Leppänen, M. T. och Kukkonen, J. V. K. (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) Dermott, R. och Munawar, M. (1992). A simple and sensitive assay for evaluation of sediment toxicity using *Lumbriculus variegatus* (Müller). Hydrobiologia 235/236: 407–414.

(35) Drewes, C. D. och Fourtner, C. R. (1990). Morphallaxis in an aquatic oligochaete, *Lumbriculus variegatus*: Reorganisation of escape reflexes in regenerating body fragments. Develop. Biol. 138: 94–103.

(36) Brinkhurst, R. O. (1971). A guide for the identification of British aquatic oligochaeta. Freshw. Biol. Assoc., Sci. Publ. No. 22.

(37) Kapitel C.1 i denna bilaga: Test avseende akut toxicitet för fisk.

(38) OECD (1992c). Guidelines for Testing of Chemicals No. 210. Fish, Early-life Stage Toxicity Test. OECD, Paris.

(39) Egeler, Ph., Römbke, J., Meller, M., Knacker, Th., Franke, C., Studinger, G. och Nagel, R. (1997). Bioaccumulation of lindane and hexachlorobenzene by tubificid sludgeworms (Oligochaeta) under standardised laboratory conditions. Chemosphere 35, s. 835–852.

(40) Meller, M., P. Egeler, J. Roembke, H. Schallnass, R. Nagel och B. Streit. (1998). Short-term Toxicity of Lindane, Hexachlorobenzene and Copper Sulphate on Tubificid Sludgeworms (Oligochaeta) in Artificial Media. Ecotox. and Environ. Safety, 39, 10–20.

(41) Egeler, Ph., Römbke, J., Knacker, Th., Franke, C. och Studinger, G. (1999). Workshop on ”Bioaccumulation: Sediment test using benthic oligochaetes”, 26–27 april 1999, Hochheim/Main, Tyskland. Report on the R+D-project No. 298 67 419, Umweltbundesamt, Berlin.

(42) Suedel, B. C. och Rodgers, J. H. (1994). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. Environ. Toxicol. Chem. 13, 1163–1175.

(43) Naylor, C. och C. Rodrigues. (1996). Development of a test method for *Chironomus riparius* using a formulated sediment. Chemosphere 31: 3291–3303.

(44) Kaster, J. L., Klump, J. V., Meyer, J., Krezoski, J. och Smith, M. E. (1984). Comparison of defecation rates of *Limnodrilus hoffmeisteri* using two different methods. Hydrobiologia 11, 181–184.

(45) Martinez-Madrid, M., Rodriguez, P., Perez-Iglesias, J. I. och Navarro, E. (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) Landrum, P. F. (1989). Bioavailability and toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed to sediments for the amphipod *Pontoporeia hoyi*. Environ. Sci. Technol. 23, 588–595.

(48) Brooke, L. T., Ankley, G. T., Call, D. J. och Cook, P. M. (1996). Gut content and clearance for three species of freshwater invertebrates. Environ. Toxicol. Chem. 15, 223–228.

(49) Mount, D. R., Dawson, T. D. och Burkhard, L. P. (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 nr 54, OECD, Paris, Frankrike.

(51) Liebig, M., Meller, M. och Egeler, P. (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 mars 2004. BfG (Bundesanstalt für Gewässerkunde), Koblenz, Tyskland, s. 107–119.

Ytterligare litteratur om statistiska metoder:

Dunnett, C. W. (1955). A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. Amer. Statist. Ass. J. 50, 1096–1121.

Dunnett, C. W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20, 482–491.

Finney D. J. (1971). Probit Analysis (tredje upplagan), s. 19–76. Cambridge Univ. Press.

Finney D. J. (1978). Statistical Method in Biological Assay. Charles Griffin & Company Ltd, London.

Hamilton, M. A., R. C. Russo och R. V. Thurston. (1977). Trimmed Spearman-Karber Method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. Environ. Sci. Technol. 11(7), 714–719; Rättelse: Environ. Sci. Technol. 12 (1998), 417.

Holm, S. (1979). A simple sequentially rejective multiple test procedure. Scand. J. Statist. 6, 65–70.

Sokal, R. R. och F. J. Rohlf. (1981) Biometry. The principles and practice of statistics in biological research. Andra upplagan. W. H. Freeman and Company. New York.

Miller, R. G., Jr. (1986). Beyond ANOVA, basics of applied statistics. John Wiley & Sons. New York.

Shapiro, S. S. och Wilk, M. B. (1965). An analysis of variance test for normality (complete samples). Biometrika 52: 591–611.

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.

▼M6

Tillägg 1

Definitioner

I denna testmetod gäller följande definitioner:

Kemikalie: ett ämne eller en blandning.

Konditioneringsperioden: används för att stabilisera den mikrobiella komponenten i sedimentet och avlägsna t.ex. ammoniak från sedimentets beståndsdelar. Den äger rum före spikningen av sedimentet med testkemikalien. Vanligtvis kastas det överliggande vattnet bort efter konditioneringen.

EC_x: den koncentration av testkemikalien i sedimentet som leder till x % (t.ex. 50 %) effekt på en biologisk parameter efter en given exponeringstid.

Stabiliseringsperiod: används för att låta testkemikalien fördela sig mellan den fasta fasen, porvattnet och det överliggande vattnet. Den äger rum efter spikningen av sedimentet med testkemikalien och före tillsatsen av testorganismerna.

Exponeringsfasen: den tid under vilken testorganismerna exponeras för testkemikalien.

Syntetiskt sediment eller rekonstituerat eller konstgjort sediment: en blandning av material som är avsedda att efterlikna de fysiska beståndsdelarna i naturligt sediment.

Lägsta koncentration med observerad effekt (LOEC – ”Lowest Observed Effect Concentration”): den lägsta testade koncentration vid vilken man kan fastställa att testkemikalien har en signifikant toxisk effekt (vid $p < 0,05$) jämfört med kontrollen. Alla testkoncentrationer ovanför LOEC måste dock ha en effekt som är minst lika stor som den som observeras vid LOEC. Om båda dessa villkor inte är uppfyllda måste en fullständig redogörelse lämnas för hur LOEC (och därmed NOEC) har valts.

Högsta koncentrationen utan observerad effekt (NOEC): den testkoncentration omedelbart under LOEC som jämfört med kontrollgruppen inte framkallar några statistiskt signifikanta verkningar ($p < 0,05$) efter en given exponeringstid.

Fördelningskoefficienten n-oktanol/vatten (K_{ow}, uttrycks ibland även som P_{ow}): förhållandet mellan en kemikalies löslighet i n-oktanol och vatten vid jämvikt. Detta är ett mått på hur lipofil kemikalien är (kapitel A.24 i denna bilaga). K_{ow} eller logaritmen av K_{ow} (log K_{ow}) används som indikator för en kemikalies potential för bioackumulering i vattenlevande organismer.

Fördelningskoefficienten organiskt kol/vatten (K_{oc}): förhållandet mellan en kemikalies koncentration i eller på sedimentets fraktion av organiskt kol och kemikaliens koncentration i vatten vid jämvikt.

Överliggande vatten: det vatten som täcker sedimentet i testkärlet.

Porvatten: det vatten som finns i mellanrummen mellan sediment- eller jordpartiklar.

Spikat sediment: sediment till vilket en testkemikalie har tillsatts.

Testkemikalie: alla ämnen eller blandningar som testas med denna testmetod.

▼**M6**

Tillägg 2

Det rekommenderade rekonstituerade vattnets sammansättning

(hämtat från kapitel C.1 i denna bilaga (1))

(a) *Kalciumkloridlösning*

Lös upp 11,76 g $CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$ i avjonat vatten och späd till 1 liter med avjonat vatten.

(b) *Magnesiumsulfatlösning*

Lös upp 4,93 g $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$ i avjonat vatten och späd till 1 liter med avjonat vatten.

(c) *Natriumbikarbonatlösning*

Lös upp 2,59 g $NaHCO_3$ i avjonat vatten och späd till 1 liter med avjonat vatten.

(d) *Kaliumkloridlösning*

Lös upp 0,23 g KCl i avjonat vatten och späd till 1 liter med avjonat vatten.

Alla kemikalier ska vara av analyskvalitet.

Konduktiviteten i det destillerade eller avjonade vattnet bör inte överstiga 10 μScm^{-1}.

25 ml av var och en av lösningarna (a) till (d) blandas och den totala volymen späds till 1 liter med avjonat vatten. Summan av kalcium- och magnesiumjonerna i dessa lösningar är 2,5 mmol/l.

Förhållandet mellan Ca- och Mg-joner är 4:1 och mellan Na- och K-joner 10:1. Syrakapaciteten $K_{S4.3}$ i denna lösning är 0,8 mmol/l.

Lufta utspädningsvattnet tills syremättnad uppnås, och lagra det sedan i ungefär två dagar utan ytterligare luftning före användning.

HÄNVISNING

(1) Kapitel C.1 i denna bilaga: Test avseende akut toxicitet för fisk.

▼**M6**

Tillägg 3

De fysikalisk-kemiska egenskaperna hos godtagbart utspädningsvatten

Komponent	Koncentrationer
Partiklar	< 20 mg/l
Halt av organiskt kol	< 2 µg/l
Ojoniserad ammoniak	< 1 µg/l
Resterande mängd klor	< 10 µg/l
Total mängd bekämpningsmedel som innehåller organiska fosforföreningar	< 50 ng/l
Total mängd bekämpningsmedel som innehåller organiska klorföreningar plus polyklorerade bifenyler	< 50 ng/l
Total mängd organiskt klor	< 25 ng/l
(hämtade från OECD (1992) (1))	

HÄNVISNING

(1) OECD (1992). Guidelines for Testing of Chemicals No. 210. Fish, Early-life Stage Toxicity Test. OECD, Paris.

▼M6

Tillägg 4

Rekommenderat syntetiskt sediment – vägledning om beredning och lagring

Sedimentets beståndsdelar

Beståndsdel	Egenskaper	% av sedimentets torrvikt
Torv	Vitmosstorv (Sphagnum), nedbrytningsgrad: ”medium”, lufttorkad, inga synliga plantrester, finmald (partikelstorlek ≤ 0,5 mm)	5 ± 0,5
Kvartssand	Kornstorlek: ≤ 2 mm, men > 50 % av partiklarna bör vara av storleken 50–200 μm	75–76
Kaolinlera	Kaolinithalt ≥ 30 %	20 ± 1
Foderkälla	t.ex. nässelpulver (Folia urticae) från blad av Urtica ciodica (brännässla), finmalet (partikelstorlek ≤ 0,5 mm), av apotekskvalitet för livsmedelsbruk, som tillsats till torrt sediment	0,4–0,5
Organiskt kol	Justeras genom tillsats av torv och sand	2 ± 0,5
Kalciumkarbonat	$CaCO_3$, pulvriserat, kemiskt rent, som tillsats till torrt sediment	0,05–1
Avjonat vatten	Konduktivitet ≤ 10 μS/cm, som tillsats till torrt sediment	30–50

Anmärkning: Om man förväntar sig förhöjda ammoniakkoncentrationer, t.ex. om testkemikalien är känd för att hämma nitrifikationen, kan det vara lämpligt att ersätta 50 % av det kväverika nässelpulvret med cellulosa (t.ex. alfacellulosapulver, kemiskt rent, partikelstorlek ≤ 0,5 mm, (1) (2)).

Beredning

Torven lufttorkas och mals ner till ett fint pulver. En suspension med den erforderliga mängden torvpulver i avjonat vatten bereds med hjälp av en högpresterande homogeniseringsapparat. Suspensionens pH justeras till 5,5 ± 0,5 med $CaCO_3$. Suspensionen konditioneras i minst två dagar under skonsam omrörning vid 20 ± 2 °C för att stabilisera pH-värdet och etablera en stabil mikrobiell komponent, varefter pH uppmäts på nytt och bör då vara 6,0 ± 0,5. Torvsuspensionen blandas sedan med de övriga beståndsdelarna (sand och kaolinlera) och avjonat vatten till ett homogent sediment med en vattenhalt som ger kring 30–50 % av sedimentets torrvikt. Den slutliga blandningens pH mäts på nytt och justeras vid behov till 6,5–7,5 med $CaCO_3$. Om man förväntar sig utveckling av ammoniak kan det vara lämpligt att hålla pH-värdet i sedimentet under 7,0 (t.ex. mellan 6,0 och 6,5). Prover tas av sedimentet för att bestämma torrvikten och halten av organiskt kol. Om man förväntar sig utveckling av ammoniak kan det syntetiska sedimentet konditioneras i sju dagar under samma betingelser som

▼M6

råder i det efterföljande testet (t.ex. ett förhållande mellan sediment och vatten på 1:4, med samma höjd på sedimentskiktet som i testkärlen) innan det spikas med testkemikalien, dvs. man bör fylla på med vatten, som bör vara luftat. I slutet av konditioneringsperioden avlägsnas det överliggande vattnet och kasseras. Därefter blandas den spikade kvartssanden med sedimentet för varje behandlingsnivå, och sedimentet fördelas sedan i replikattestkärlen, som fylls på med testvatten. Kärlen inkuberas därefter under samma betingelser som råder i det efterföljande testet. Det är nu stabiliseringsperioden inleds. Det överliggande vattnet bör luftas.

Den valda foderkällan bör tillsättas före eller under spikningen av sedimentet med testkemikalien. Inledningsvis kan den blandas med torvsuspensionen (se ovan). Man kan dock undvika onödig försämring av foderkällan före tillsatsen av testorganismerna – t.ex. vid långa stabiliseringsperioder – genom att man påbörjar exponeringen så snart som möjligt efter fodertillsatsen. För att se till att fodret spikas med testkemikalien bör foderkällan blandas med sedimentet senast samma dag som sedimentet spikas med testkemikalien.

Förvaring

Det syntetiska sedimentets torra beståndsdelar kan lagras i ett torrt och svalt utrymme eller vid rumstemperatur. Det beredda sedimentet som spikats med testkemikalien ska omedelbart användas i testet. Prover av spikat sediment kan förvaras under de förhållanden som rekommenderas för testkemikalien i fråga fram till analysen.

HÄNVISNINGAR

(1) Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H. J. och Gilberg, D. (2005). Validation of a sediment toxicity test with the endobenthic aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus* by an international ring test. I samarbete med R. Nagel och B. Karaoglan. Rapport till den federala tyska miljöskyddsmyndigheten (Umweltbundesamt, Berlin), R&D nr: 202 67 429.

(2) Liebig, M., Meller, M. och Egeler, P. (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 mars 2004. BfG (Bundesanstalt für Gewässerkunde), Koblenz, Tyskland, s. 107–119.

▼M6

Tillägg 5

Odlingsmetoder för *Lumbriculus variegatus*

Lumbriculus variegatus (Müller) (Lumbriculidae, Oligochaeta) lever i sötvattenssediment och används ofta i ekotoxikologisk testning. Den kan lätt odlas under laboratorieförhållanden. En sammanfattning av odlingsmetoderna ges nedan.

Odlingsmetoder

Odlingsbetingelser för *Lumbriculus variegatus* beskrivs i detalj i Phipps m.fl. (1993) (1), Brunson m.fl. (1998) (2), ASTM (2000) (3), den amerikanska miljöskyddsmyndigheten (EPA) (2000) (4). En kort sammanfattning av dessa betingelser ges nedan. En stor fördel med *L. variegatus* är dess snabba reproduktionstakt, vilket leder till en snabbt ökande biomassa i laboratorieodlade populationer (t.ex. (1), (3), (4), (5)).

Maskarna kan odlas i stora akvarier (57–80 liter) vid 23 °C med en fotoperiod på 16 L:8 M (100–1 000 lux). Man använder då naturligt vatten som förnyas dagligen (45–50 liter per akvarium). Substratet bereds genom att oblekta bruna pappersservetter klipps till remsor som sedan blandas med odlingsvatten i några sekunder, vilket leder till att man får små bitar av papperssubstrat. Detta substrat kan sedan omedelbart användas i odlingsakvarierna för *Lumbriculus* genom att botten av behållaren täcks, eller lagras frysta i avjonat vatten för senare användning. Det nya substratet i akvariet räcker i allmänhet i cirka två månader.

Varje maskodling inleds med 500–1 000 maskar som utfodras tre gånger per vecka under förnyelse- eller genomflödesförhållanden med en 10 ml lösning innehållande 6 g yngelfoder för foreller. Statiska eller semistatiska odlingar bör utfodras mindre ofta för att förebygga tillväxt av bakterier och svampar.

Under dessa förhållanden kommer antalet individer i odlingen i allmänhet att fördubblas på cirka 10–14 dagar.

Alternativt kan *Lumbriculus variegatus* också odlas i ett system med ett skikt av kvartssand som används som syntetiskt sediment (1–2 cm djupt) och rekonstituerat vatten. Behållare av glas eller rostfritt stål med en höjd på 12–20 cm kan användas som odlingskärl. Vattnet ska luftas försiktigt (t.ex. två bubblor per sekund) med en pasteurpipett placerad ca 2 cm ovanför sedimentets yta. För att undvika ackumulering t.ex. av ammoniak bör det överliggande vattnet bytas med hjälp av ett genomflödessystem, eller manuellt minst en gång i veckan. Oligochaeterna kan hållas vid rumstemperatur med en fotoperiod på 16 h ljus (ljusintensitet 100–1 000 lux) och 8 h mörker. I den semistatiska odlingen (förnyelse av vattnet en gång per vecka) utfodras maskarna med TetraMin två gånger per vecka (t.ex. 0,6–0,8 mg per cm^2 sedimentyta), vilket kan appliceras som en suspension med 50 mg TetraMin per ml avjonat vatten.

Lumbriculus variegatus kan avlägsnas från odlingarna t.ex. genom överföring av substrat med hjälp av ett finmaskat nät, eller med hjälp av en flampolerad glaspipett med bred spets (ca 5 mm i diameter), till en separat bägare. Om man också överför substrat till denna bägare låter man bägaren som innehåller maskar och substrat stå över natten under genomflödesförhållanden, vilket gör att substratet avlägsnas från bägaren medan maskarna blir kvar på kärlets botten. Maskarna kan sedan överföras till nyligen beredda odlingsakvarier eller bearbetas ytterligare för testet enligt beskrivning i (3) och (4), eller nedan.

Något som bör beaktas kritiskt vid användning av *L. variegatus* i sediment är dess reproduktionssätt (fragmentering (architomy) eller regenerering (morphallaxis), t.ex. (6)). Resultatet av denna asexuella förökning är två delar som inte intar någon föda förrän den främre eller bakre delen regenererats (t.ex. (7), (8)). Detta innebär att *L. variegatus* inte exponeras kontinuerligt via intag av förorenat sediment.

▼M6

Därför bör en synkronisering utföras för att minimera okontrollerad reproduktion och regenerering, som båda leder till stora variationer i testresultaten. Denna variation kan inträffa om vissa individer, som har genomgått delning och därmed inte intar någon föda under en viss tid, i mindre grad exponeras för testkemikalien än andra individer som inte genomgår delning under testet (9), (10), (11). Maskarna bör delas på konstgjord väg 10 till 14 dagar före början av exponeringen (synkronisering). Stora (adulta) maskar, som helst inte visar några tecken på nyligen genomgången regenerering (morphallaxis) bör väljas ut för synkronisering. Dessa maskar kan placeras på ett objektglas med en droppe odlingsvatten och skäras av på den mittersta kroppsregionen med en skalpell. Man bör se till att de bakre ändarna är av liknande storlek. Man bör sedan låta de bakre ändarna återbilda nya huvuden i ett kulturkärl som innehåller samma substrat som används i kulturen och rekonstituerat vatten tills exponeringen inleds. Tecknet på att regenereringen av nya främre delar pågår är att de synkroniserade maskarna gräver sig igenom i substratet (närvaron av återbildade huvuddelar kan bekräftas genom att ett representativt delprov granskas i ett binokulärt mikroskop). Testorganismerna kan därefter förväntas befinna sig i ett liknande fysiologiskt tillstånd. Detta innebär att när de synkroniserade maskarna reproducerar sig genom regenerering (morphallaxis) under testets gång exponeras praktiskt taget alla djur i lika hög grad för det spikade sedimentet. De synkroniserade maskarna bör utfodras så snart de börjar gräva sig genom substratet, eller sju dagar efter delningen. Utfodringen bör vara jämförbar med den i de vanliga odlingarna, men det är tillrådligt att ge de synkroniserade maskarna samma foder som ska användas i testet. Maskarna bör hållas i samma temperatur som i testet, dvs. 20 ± 2 °C. Efter regenerering under 10–14 dagar bör intakta hela maskar som aktivt simmar eller kryper efter lätt mekanisk retning användas för testet. Skador eller autotomi bör undvikas, t.ex. genom att man använder pipetter med flampolerade kanter eller tandläkarsonder av rostfritt stål vid hanteringen av maskarna.

Källor för startkulturer för *Lumbriculus variegatus* (adresserna i USA har tagits från (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
FI-80101 Joensuu
FINLAND

Technische Universität Dresden
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

Förenta staterna

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 Laboratorium, NOAA
2205 Commonwealth Boulevard
Ann Arbor, MI 48105-1593

HÄNVISNINGAR

(1) Phipps, G. L., Ankley, G. T., Benoit, D. A. och Mattson, V. R. (1994). Use of the aquatic Oligochaete *Lumbriculus variegatus* for assessing the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants. Environ.Toxicol. Chem. 12, 269–279.

(2) Brunson, E. L., Canfield, T. J., Ingersoll, C. J. och Kemble, N. E. (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. I ASTM International 2004 Annual Book of Standards. Vol. 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. Andra upplagan. EPA 600/R-99/064, amerikanska miljöskyddsmyndigheten (EPA), Duluth, MN, mars 2000.

(5) Kukkonen, J. och Landrum, P. F. (1994). Toxicokinetics and toxicity of sediment-associated Pyrene to *Lumbriculus variegatus* (Oligochaeta). Environ. Toxicol. Chem. 13, 1457–1468.

(6) Drewes, C. D. och Fourtner, C. R. (1990). Morphallaxis in an aquatic oligochaete, *Lumbriculus variegatus*: Reorganisation of escape reflexes in regenerating body fragments. Develop. Biol. 138: 94–103.

(7) Leppänen, M. T. och Kukkonen, J. V. K. (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) Leppänen, M. T. och Kukkonen, J. V. K. (1998b). Factors affecting feeding rate, reproduction and growth of an oligochaete *Lumbriculus variegatus* (Müller). Hydrobiologia 377, 183–194.

(9) Brust, K., O. Licht, V. Hultsch, D. Jungmann och R. Nagel (2001). Effects of Terbutryn on Aufwuchs and *Lumbriculus variegatus* in Artificial Indoor Streams. Environ. Toxicol. Chemistry, vol. 20, s. 2000–2007.

(10) Oetken, M., K.-U. Ludwichowski och R. Nagel (2000). Sediment tests with *Lumbriculus variegatus* and *Chironomus riparius* and 3,4-dichloroaniline (3,4-DCA) within the scope of EG-AltstoffV. På uppdrag av den federala tyska miljöskyddsmyndigheten (Umweltbundesamt, Berlin), FKZ 360 12 001, mars 2000.

(11) Leppänen, M. T. och Kukkonen, J. V. K. (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

Tillägg 6

Sammanfattning av ringtestresultaten

Sedimenttoxicitetstest med *Lumbriculus variegatus*

Tabell 1

Resultat av enskilda ringtestomgångar: Genomsnittligt antal maskar i kontrollerna och i kontrollerna med lösningsmedel vid testets slut; SD = standardavvikelse; CV = variationskoefficient.

	antal maskar i kontrollerna (genomsnitt)	SD	CV (%)	n	antal maskar i kontrollerna med lösn. medel (genomsnitt)	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
interlaboratorivt medelvärde	**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**			
max	**42,0**				**43,7**			
CV (%)	**28,1**				**24,7**			

▼M6

Tabell 2

Resultat av enskilda ringtestomgångar: Maskarnas genomsnittliga totala torrvikt per replikat i kontroller och kontroller med lösningsmedel i slutet av testet; SD = standardavvikelse; CV = variationskoefficient.

	maskarnas torrvikt totalt per replikat (kontroller)	SD	CV (%)	n	maskarnas torrvikt totalt per replikat (kontroller med lösningsmedel)	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
interlaborativt medelvärde	**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**			
max	**41,3**				**41,4**			
CV (%)	**31,3**				**26,8**			

▼M6

Tabell 3

Toxicitet, PCP: Sammanfattning av endpoints i ringtestet; interlaborativa medelvärden för EC50, NOEC och LOEC; SD = standardavvikelse; CV = variationskoefficient.

biologisk parameter		inter-laborativt medelvärde (mg/kg)	min	max	inter-laborativ faktor	SD	CV (%)	geo-metriskt medel-värde (mg/kg)
totalt antal maskar	**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				
maskarnas torrvikt totalt	**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				
dödlighet/överlevnad	**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 (ökning av antalet maskar per 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				
tillväxt (ökning av biomassan per 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: minsta observerbara skillnad jämfört med kontrollvärdena under hypotesprövningen, använt som ett mått på statistisk styrka

HÄNVISNING

Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H. J. och Gilberg, D. (2005). Validation of a sediment toxicity test with the endobenthic aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus* by an international ring test. I samarbete med R. Nagel och B. Karaoglan. Rapport till den federala tyska miljöskyddsmyndigheten (Umweltbundesamt, Berlin), R&D nr: 202 67 429.

▼M6

C.36 REPRODUKTIONSTEST FÖR ROVKVALSTER (*HYPOASPIS* (*GEOLAELAPS*) *ACULEIFER*) I JORD

INLEDNING

1. Denna testmetod motsvarar OECD:s testriktlinje (TG) 226 (2008). Metoden är avsedd att användas för bestämning av effekterna av kemikalier i jord på reproduktionskapaciteten hos den jordlevande kvalsterarten *Hypoaspis* (*Geolaelaps*) *aculeifer* Canestrini (Acari: Laelapidae), och gör det möjligt att fastställa hämningen av den specifika tillväxthastigheten hos en population (1) (2). Reproduktionskapaciteten innebär här antalet juveniler i slutet av testperioden. *H. aculeifer* representerar ytterligare en trofisk nivå jämfört med de arter för vilka testmetoder redan finns tillgängliga. Ett reproduktionstest utan särskiljning och kvantifiering av reproduktionscykelns olika stadier anses tillräckligt för denna testmetod. För kemiska ämnen med en annan exponeringsväg än via jord kan andra metoder vara lämpligare (3).

2. *Hypoaspis* (*Geolaelaps*) *aculeifer* anses vara en lämplig representant för markfaunan i allmänhet och rovkvalster i synnerhet. Arten finns över hela världen (5) och kan lätt samlas in och odlas i laboratoriet. En sammanfattning av biologin hos *H. aculeifer* finns i tillägg 7. Bakgrundsinformation om kvalsterartens ekologi och dess användning i ekotoxikologisk testning finns i (4), (5), (6), (7), (8), (9), (10), (11), (12).

PRINCIP FÖR TESTMETODEN

3. Adulta honor exponeras för en serie koncentrationer av testkemikalien som blandas ner i jorden. Testet inleds med tio adulta honor per replikatkärl. Hanar införs inte i testet, eftersom erfarenheten har visat att honor parar sig omedelbart eller kort efter att de kläckts från deutonymfstadiet om det är hanar närvarande. Dessutom skulle hanarnas närvaro förlänga testet på ett sätt som gör att ett arbetskrävande särskiljande av olika åldersstadier blir nödvändigt. Parning ingår således inte i testet. Honorna införs i provet 28–35 dagar efter äggläggningsperiodens början under synkroniseringsstadiet (se tillägg 4), eftersom man då kan betrakta det som att honorna redan har parat sig och genomgått förstadiet till äggläggningen. Vid en temperatur på 20 °C slutar testet på dag 14 efter införandet av honor (dag 0) vilket gör det möjligt för den första kontrollavkomman att nå deutonymfstadiet (se tillägg 4). Den viktigaste uppmätta variabeln är antalet juveniler per testkärl och dessutom antalet överlevande honor. Reproduktionskapaciteten hos de kvalster som exponeras för testkemikalien jämförs med reproduktionskapaciteten i kontrollerna för att bestämma ECx-värden (t.ex. EC10, EC50) och den högsta koncentrationen utan observerad effekt (NOEC) (se tillägg 1 för definitioner), beroende på försökets utformning (se punkt 29). En översikt över testschemat finns i tillägg 8.

INFORMATION OM TESTKEMIKALIEN

4. Testkemikaliens vattenlöslighet, log K_{ow}, fördelningskoefficient jord/vatten och ångtryck ska helst vara kända. Det är önskvärt med ytterligare uppgifter om testkemikaliens omvandling, spridning och fördelning i jord, t.ex. i form av biotisk och abiotisk nedbrytningshastighet.

5. Testmetoden kan användas för kemikalier som är lösliga eller olösliga i vatten. Testkemikaliens appliceringsmetod måste dock anpassas i enlighet med detta. Testmetoden kan inte användas för flyktiga kemikalier, dvs. kemikalier för vilka Henrys konstant eller fördelningskoefficienten luft/vatten är större än ett, eller kemikalier för vilka ångtrycket överstiger 0,0133 Pa vid 25 °C.

▼M6

TESTETS GILTIGHET

6. Följande kriterier bör uppfyllas i de obehandlade kontrollerna för att testresultatet ska anses vara giltigt:

— Honornas genomsnittliga dödlighet bör inte överskrida 20 % vid testets slut.

— Det genomsnittliga antalet juveniler per replikat (med ursprungligen tio adulta honor) bör vara minst 50 vid testets slut.

— Variationskoefficienten som beräknas för antalet juveniler per replikat bör inte överstiga 30 % vid det definitiva testets slut.

REFERENSKEMIKALIE

7. ECx eller NOEC för en referenskemikalie måste fastställas för att säkerställa att testförhållandena i laboratoriet är tillräckliga goda och för att kontrollera att testorganismernas respons inte har förändrats med tiden. Dimetoat (CAS-nr 60-51-5) är en lämplig referenskemikalie som har visat sig påverka populationsstorleken (4). Borsyra (CAS-nr 10043-35-3) kan användas som en alternativ referenskemikalie. Man har mindre erfarenhet av denna kemikalie. Två utformningslösningar är möjliga:

— Referenskemikalien kan testas parallellt med att toxiciteten bestäms för varje testkemikalie vid en koncentration vars kapacitet att leda till en effekt på > 50 % reducering av avkomman måste styrkas på förhand i en dos-responsstudie. I detta fall bör antalet replikat vara detsamma som i kontrollerna (se punkt 29).

— Alternativt kan referenskemikalien testas 1–2 gånger per år i ett dos-responstest. Antalet koncentrationer, replikat, och avståndsfaktorn varierar beroende på den valda utformningen (se även punkt 29), men man bör uppnå en respons på 10–90 % effekt (avståndsfaktor 1,8). EC_{50} för dimetoat baserat på antalet juveniler bör ligga i intervallet mellan 3,0 och 7,0 mg verksamt ämne/kg jord (torrvikt). På grundval av de resultat som hittills erhållits med borsyra bör EC_{50} baserat på antalet juveniler ligga i intervallet 100–500 mg/kg torrvikt jord.

BESKRIVNING AV TESTET

Testkärl och annan utrustning

8. Man bör använda testkärl av glas eller annat kemiskt inert material med en storlek på 3–5 cm i diameter (jordlagrets höjd ≥ 1,5 cm) och som har tättslutande lock. Skruvlock är att föredra och i så fall kan kärlen luftas två gånger i veckan. Alternativt kan man använda lock som möjliggör direkt gasutbyte mellan substratet och den omgivande luften (t.ex. gasväv). Eftersom vattenhalten måste vara tillräckligt hög under testet är det viktigt att kontrollera varje testkärls vikt under testets gång och vid behov fylla på med vatten. Detta kan vara särskilt viktigt om inga skruvlock finns att tillgå. Om ett ogenomskinligt testkärl används ska locket vara gjort av ett material som möjliggör tillgång till ljus (t.ex. ett perforerat genomskinligt lock) och samtidigt förhindrar att kvalster slipper ut. Testkärlets storlek och typ beror på extraktionsmetoden (se tillägg 5 för detaljer). Om värmeextraktion ska användas direkt i testkärlet kan man infoga ett bottennät med lämplig maskstorlek (som hålls förseglat till dess att extraktionen inleds), och jorden bör vara tillräckligt djup för att tillåta en ökning av temperatur och fuktighet.

▼M6

9. Normal laboratorieutrustning krävs, och i synnerhet följande:

— helst glasbehållare med skruvlock,

— torkskåp,

— stereomikroskop,

— borstar för överföring av kvalster,

— pH-mätare och luxmätare,

— en lämplig exakt våg,

— lämplig utrustning för temperaturreglering,

— lämplig utrustning för reglering av luftfuktigheten (inte nödvändigt om exponeringskärlen har lock),

— temperaturreglerad inkubator eller ett temperaturreglerat litet rum,

— utrustning för extraktion (se tillägg 5) (13),

— överliggande ljusarmatur med ljusreglage,

— insamlingsburkar för extraherade kvalster.

Beredning av den syntetiska jorden

10. I detta test används syntetisk jord. Den syntetiska jorden består av följande komponenter (alla värden baseras på torrvikt):

— 5 % vitmosstorv (*Sphagnum*), lufttorkad och finmald (en partikelstorlek på 2 ± 1 mm kan godtas),

— 20 % kaolinlera (kaolinithalt helst över 30 %).

— Cirka 74 % lufttorkad industrisand (beroende på den mängd $CaCO_3$ som behövs), främst fin sand där mer än 50 % av partiklarna har storleken 50–200 μm. Den exakta mängden sand beror på mängden $CaCO_3$ (se nedan). De bör tillsammans utgöra 75 %.

— < 1,0 % kalciumkarbonat ($CaCO_3$, pulvriserat, av analyskvalitet) tillsatt för att få ett pH-värde på 6,0 ± 0,5. Mängden kalciumkarbonat som ska tillsättas beror främst på torvens kvalitet/beskaffenhet (se anmärkning 1).

Anmärkning 1: Den mängd $CaCO_3$ som behövs beror på jordsubstratets beståndsdelar och bör bestämmas genom mätning av pH-värdet i delproverna med jord omedelbart före testets början (14).

Anmärkning 2: Torvinnehållet i den syntetiska jorden avviker från torvinnehållet i andra testmetoder för markorganismer, där man i de flesta fall använder 10 % torv (t.ex. (15)). Enligt EPPO (16) innehåller en typisk jordbruksmark dock högst 5 % organiskt material, och minskningen av torvinnehållet återspeglar således de minskade möjligheterna i en naturlig jord till sorption av testkemikalien till organiskt kol.

Anmärkning 3: Om så krävs, t.ex. för särskilda teständamål, kan även naturliga jordar från oförorenade platser användas som test- och/eller odlingssubstrat. Om naturjord används bör man minst ange dess ursprung (insamlingsplats), pH, textur (partikelstorleksfördelning) och halten av organiskt material. Om möjligt bör man även ange jordens typ och namn i

▼M6

enlighet med jordklassificering, och jorden måste vara fri från eventuella föroreningar. Om testkemikalien är en metall eller en metallorganisk förening bör även katjonbyteskapaciteten (CEC) hos den naturliga jorden fastställas. Särskild uppmärksamhet bör ägnas åt att uppfylla giltighetskriterierna eftersom bakgrundsinformation om naturjordar vanligtvis är sällsynt.

11. Jordens torra beståndsdelar blandas omsorgsfullt (t.ex. i en storskalig laboratorieblandare). För bestämning av pH-värdet används en blandning av jord och 1 M kaliumklorid (KCl) eller 0,01 M kalciumkloridlösning ($CaCl_2$) i förhållandet 1:5 (se (14) och tillägg 3). Om jorden är surare än det intervall som krävs (se punkt 10) kan detta justeras genom tillsats av en lämplig mängd $CaCO_3$. Om jorden är för alkalisk kan detta justeras genom tillsats av mer av en blandning innehållande de första tre komponenterna som beskrivs i punkt 10, men inget $CaCO_3$.

12. Den syntetiska jordens maximala vattenhållningskapacitet (WHC) bestäms i enlighet med de förfaranden som beskrivs i tillägg 2. Två till sju dagar innan testet inleds förhandsfuktas den torra syntetiska jorden med tillräcklig mängd destillerat eller avjonat vatten till en vattenhalt som motsvarar cirka hälften av den slutliga vattenhalten, dvs. 40–60 % av den maximala vattenhållningskapaciteten (WHC). Fukthalten justeras till 40–60 % av den maximala vattenhållningskapaciteten (WHC) genom tillsats av lösningen med testkemikalien och/eller destillerat eller avjonat vatten (se punkterna 16–18). Ytterligare en summarisk kontroll av jordens fukthalt kan göras genom att man försiktigt pressar jorden i handen, och om vattenhalten är korrekt sipprar små vattendroppar ut mellan fingrarna.

13. Jordens fukthalt bestäms i början och i slutet av testet genom torkning till konstant vikt vid 105 °C i enlighet med ISO 11465 (17), och jordens pH-värde i enlighet med tillägg 3 eller ISO 10390 (14). Dessa mätningar bör utföras på ytterligare prover utan kvalster, både från jorden i kontrollerna och från testjorden för varje testkoncentration. Jordens pH-värde bör inte justeras när sura och basiska kemikalier testas. Vattenhalten bör övervakas under testets gång genom att kärlen regelbundet vägs (se punkterna 20 och 24).

Urval och förberedelse av försöksdjuren

14. Den art som används i testet är *Hypoaspis* (*Geolaelaps*) *aculeifer* (Canestrini, 1883). Man måste ha adulta kvalsterhonor som kommer från en synkroniserad kohort för att påbörja testet. Kvalstren bör introduceras ca 7–14 dagar efter att de har nått adult stadium, 28–35 dagar efter inledningen av äggläggningen under synkroniseringen (se punkt 3 och tillägg 4). Kvalstrens ursprung eller leverantören av laboratorieodlingen samt underhållet av denna bör anges. Om man håller en laboratorieodling rekommenderas det att man bekräftar identiteten på den art som används minst en gång om året. En identifieringsblankett bifogas som tillägg 6.

Beredning av testkoncentrationer

15. Testkemikalien blandas ner i jorden. Organiska lösningsmedel som används för att underlätta behandlingen av jorden med testkemikalien bör väljas på grundval av deras låga toxicitet för kvalster och en lämplig kontroll med lösningsmedel ska tas med i testupplägget (se punkt 29).

Testkemikalier som är lösliga i vatten

16. En lösning av testkemikalien bereds i avjonat vatten i tillräcklig mängd för att räcka till alla replikat av en testkoncentration. Det rekommenderas att man använder en lämplig mängd vatten för att nå önskad fukthalt, dvs. 40–60 % av den maximala vattenhållningskapaciteten (WHC) (se punkt 12). Varje lösning av testkemikalien blandas grundligt med ett parti förhandsfuktad jord innan den tillsätts i testkärlet.

▼M6

Testkemikalier som är olösliga i vatten

17. För kemikalier som inte är lösliga i vatten men som är lösliga i organiska lösningsmedel kan testkemikalien lösas upp i minsta möjliga volym i en lämplig vehikel (t.ex. aceton). Endast flyktiga lösningsmedel bör användas. När sådana vehiklar används ska alla testkoncentrationer och kontrollen innehålla samma minsta mängd av vehikeln. Vehikeln sprejas på eller blandas ner i en liten mängd, till exempel 10 g, fin kvartssand. Den totala halten av sand i substratet bör korrigeras för denna mängd. Vehikeln avlägsnas genom avdunstning i dragskåp under minst 1 timme. Blandningen av kvartssand och testkemikalie tillförs den på förhand fuktade jorden och blandas omsorgsfullt med en lämplig mängd avjonat vatten för att få den fuktighet som krävs. Den slutliga blandningen tillsätts i testkärlen. Observera att vissa lösningsmedel kan vara toxiska för kvalster. Det rekommenderas därför att man använder en extra vattenkontroll utan vehikel om lösningsmedlets toxicitet för kvalster inte är känd. Om det kan påvisas att lösningsmedlet (i de koncentrationer som ska användas) inte har någon effekt, kan vattenkontrollen uteslutas.

Testkemikalier som är svårlösliga i vatten och i organiska lösningsmedel

18. För kemikalier som är svårlösliga i vatten och i organiska lösningsmedel blandas motsvarande 2,5 g finmald kvartssand per testkärl (t.ex. 10 g fin kvartssand för fyra replikat) med den mängd testkemikalie som behövs för att få önskad testkoncentration. Den totala halten av sand i substratet bör korrigeras för denna mängd. Blandningen av kvartssand och testkemikalie tillförs den förhandsfuktade jorden och blandas omsorgsfullt efter tillsats av lämplig mängd avjonat vatten för att få önskad fukthalt. Den slutliga blandningen fördelas mellan testkärlen. Förfarandet upprepas för varje testkoncentration, och en lämplig kontroll upprättas också.

FÖRFARANDE

Testgrupper och kontroller

19. Tio adulta honor i 20 g torrvikt syntetisk jord rekommenderas för varje kontrollkärl och testkärl. Testorganismerna bör tillföras inom 2 timmar efter beredningen av det slutliga testsubstratet (dvs. efter applicering av testämnet). I särskilda fall (t.ex. om åldrande betraktas som en avgörande faktor) kan tiden mellan beredningen av det slutliga testsubstratet och tillförandet av kvalster förlängas (för detaljer om sådant åldrande, se (18)). I sådana fall ska en vetenskaplig motivering lämnas.

20. Efter det att man tillsatt kvalster i jorden utfodras kvalstren och den ursprungliga vikten av varje testkärl mäts för att användas som referens vid kontrollen av vattenhalten under testets gång enligt beskrivning i punkt 24. Testkärlen täcks därefter enligt beskrivningen i punkt 8 och placeras i testkammaren.

21. Lämpliga kontroller bereds för varje metod för applicering av testkemikalien enligt beskrivning i punkterna 15–18. De relevanta förfarandena för beredning av kontrollerna följs förutom att testkemikalien inte läggs till. I förekommande fall tillsätts organiska lösningsmedel, kvartssand eller andra vehiklar i kontrollerna i de koncentrationer eller mängder som motsvarar dem som används i testkärlen. Om ett lösningsmedel eller annan vehikel används för tillsats av testkemikalien bör en ytterligare kontroll utan vehikeln eller testkemikalien också beredas och testas om toxiciteten för lösningsmedlet inte är känd (se punkt 17).

▼M6

Testbetingelser

22. Testtemperaturen bör vara 20 ± 2 °C. Temperaturen registreras minst en gång per dag och justeras vid behov. Testet utförs under kontrollerade ljus-/mörkercykler (helst 16 h ljus/8 h mörker) med belysning på 400–800 lux där testkärlen förvaras. För jämförbarhetens skull bör dessa villkor vara desamma som i andra ekotoxikologiska jordtester (t.ex. (15)).

23. Om skruvlock används bör gasutbytet säkras genom att testkärlen luftas minst två gånger per vecka. Om gasvävsöverdrag används bör man vara särskilt noga med att upprätthålla jordens fukthalt (se punkterna 8 och 24).

24. Jordsubstratets vatteninnehåll i testkärlen bibehålls under hela provningen genom att kärlen vägs, och vid behov tillsätts vatten regelbundet till testkärlen (t.ex. en gång per vecka). Förluster fylls på vid behov med avjonat vatten. Vattenhalten under provningen bör inte avvika med mer än 10 % från startvärdet.

Utfodring

25. Ostor (*Tyrophagus putrescentiae* (Schrank, 1781)) har visat sig vara en lämplig foderkälla. Små hoppstjärtar (t.ex. juveniler av *Folsomia candida* Willem, 1902 eller *Onychiurus fimatus*) (19), (20), småringmaskar (t.ex. *Enchytraeus crypticus* Westheide & Graefe, 1992) eller rundmaskar (t.ex. *Turbatrix silusiae* de Man, 1913) kan också användas (21). Det rekommenderas att man kontrollerar fodret innan man använder det i ett test. Fodret bör vara av en typ och mängd som säkerställer att ett tillräckligt antal juveniler produceras för att uppfylla kriterierna för testresultatens giltighet (punkt 6). Vid valet av bytesdjur bör verkningssättet hos testkemikalien beaktas (en acaricid kan t.ex. vara toxisk även för foderkvalstren, se punkt 26).

26. Testorganismerna bör ha fri tillgång till foder (dvs. en liten mängd varje gång (så mycket som ryms på spetsen av en spatel)). I detta syfte kan även en exhaustor med låg sugkraft användas, som föreslogs i testet för hoppstjärtar. Det är vanligtvis tillräckligt att tillhandahålla foder i början av testet och därefter två till tre gånger per vecka. När testämnet förefaller vara giftigt för bytesdjuren bör man överväga en ökad utfodringstakt och/eller en alternativ foderkälla.

Val av testkoncentrationer

27. Tidigare kunskap om testkemikaliens toxicitet är till hjälp vid valet av lämpliga testkoncentrationer, t.ex. från preliminära test. Vid behov kan ett preliminärt test utföras med fem koncentrationer av testkemikalien i intervallet 0,1–1 000 mg/kg torrvikt jord, med minst ett replikat för testkärl och kontroll. Varaktigheten för det preliminära testet är 14 dagar, varefter dödligheten för adulta kvalster och antalet avkommor fastställs. Koncentrationsintervallet i det slutliga testet bör helst väljas så att det omfattar koncentrationer vid vilka antalet juveniler påverkas medan föräldragenerationens överlevnad inte påverkas. Detta kan eventuellt inte vara möjligt för kemikalier som orsakar letala och subletala effekter vid nästan samma koncentrationer. Effektkoncentrationen (t.ex. EC_{50}, EC_{25}, EC_{10}) och det koncentrationsintervall som är relevant för testkemikalien bör omges av de koncentrationer som ingår i testet. Man bör endast i undantagsfall extrapolera långt under den lägsta koncentration som påverkar testorganismerna eller över den högsta koncentration som testats, och en fullständig förklaring ska då ingå i rapporten.

Testets utformning

Dos-responstester

28. Tre testupplägg föreslås, utifrån rekommendationerna från ett annat ringtest (reproduktionstest för småringmaskar (22)). Den allmänna lämpligheten hos

▼M6

dessa upplägg bekräftades genom resultatet från valideringen för *H. aculeifer*.

29. Vid valet av koncentrationsintervall bör man beakta följande:

— För bestämning av EC_x (t.ex. EC_{10}, EC_{50}) bör tolv koncentrationer testas. Det rekommenderas att man använder minst två replikat för varje koncentration av testkemikalien och sex kontrollreplikat. Koncentrationernas inbördes avståndsfaktor kan variera, dvs. den kan vara mindre än eller lika med 1,8 i det förväntade effektintervallet och större än 1,8 vid högre och lägre koncentrationer.

— För bestämning av NOEC bör minst fem koncentrationer i en geometrisk serie testas. Det rekommenderas att man använder fyra replikat för varje testkoncentration plus åtta kontroller. Koncentrationerna bör skilja sig åt med en faktor på högst 2,0.

— Ett kombinerat tillvägagångssätt möjliggör bestämning av både ECx och NOEC. Man bör använda åtta testkoncentrationer i en geometrisk serie. Fyra replikat per exponering plus åtta kontroller rekommenderas. Koncentrationerna bör skilja sig åt med en faktor på högst 1,8.

Toleranstest

30. Om inga effekter observeras vid den högsta koncentrationen i det preliminära testet (dvs. 1 000 mg/kg torrvikt jord), kan det definitiva reproduktionstestet utföras som ett toleranstest med en koncentration på 1 000 mg/kg torrvikt jord. Ett toleranstest gör det möjligt att visa att NOEC eller EC_{10} för reproduktion är större än gränskoncentrationen, samtidigt som man minimerar antalet kvalster som används i testet. Åtta replikat bör användas både för den behandlade jorden och för kontrollen.

Testets varaktighet och mätningar

31. Alla observerade skillnader mellan kvalstrens beteende och morfologi i kontrollen och i testkärlen bör registreras.

32. På dag 14 extraheras de överlevande kvalstren från jorden genom värme-/ljusextraktion eller med en annan lämplig metod (se tillägg 5). Antalet juveniler (dvs. larver, protonymfer och deutonymfer) och adulter räknas separat. Alla adulter som inte hittats vid denna tidpunkt ska registreras som döda, under förutsättning att dessa kvalster har dött och brutits ned före bedömningen. Extraktionens effektivitet ska valideras en eller två gånger per år i kontroller med ett känt antal adulter och juveniler. Effektiviteten bör vara över 90 % i genomsnitt för alla utvecklingsstadier tillsammans (se tillägg 5). Summorna av adulter och juveniler är inte effektivitetsjusterade.

DATA OCH RAPPORTERING

Behandling av resultaten

33. Information om de statistiska metoder som kan användas för att analysera testresultaten ges i punkterna 36–41. OECD:s dokument 54, *Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application* (31), bör konsulteras.

34. Testets huvudsakliga endpoint är reproduktionskapacitet, i det här fallet det antal avkommor som produceras per replikattestkärl (i vilka tio adulta honor införts). I den statistiska analysen ska det aritmetiska medelvärdet (X) och

▼M6

variansen (s^2) för reproduktionskapaciteten beräknas per testkärl och kontroll. X och s^2 används för ANOVA-förfaranden såsom Students t-test, Dunnetts test eller Williams test samt för beräkning av konfidensintervaller på 95 %.

Anmärkning: denna huvudsakliga endpoint motsvarar fekunditeten mätt som antalet levande avkommor som producerats under testets gång dividerat med antalet moderdjur som infördes i början av testet.

35. Antalet överlevande honor i de obehandlade kontrollerna är ett viktigt giltighetskriterium och måste dokumenteras. Liksom i det preliminära testet bör alla andra skadliga tecken registreras även i den slutliga rapporten.

ECx

36. ECx-värdena, inklusive deras sammanhörande nedre och övre 95-procentiga konfidensintervall för den parameter som beskrivs i punkt 34, beräknas med hjälp av lämpliga statistiska metoder (t.ex. probit-analys, logistiska funktioner eller Weibull-funktioner, den modifierade Spearman-Kärbermetoden eller enkel interpolering). EC_x beräknas genom att ett värde som motsvarar x % av medelvärdet för kontrollen införs i den ekvation som erhållits. För att beräkna EC_{50} eller något annat ECx-värde bör en regressionsanalys utföras på medelvärdena per testkärl (X).

NOEC/LOEC

37. Om en statistisk analys används för att bestämma NOEC/LOEC är det nödvändigt att sammanställa statistiska uppgifter för varje enskilt kärl (enskilda kärl anses utgöra replikat). Lämpliga statistiska metoder ska användas (enligt OECD:s dokument 54, *Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application*). I allmänhet ska negativa effekter av testämnet jämfört med kontrollen undersökas genom en ensidig (mindre) hypotesprövning vid $p \leq 0{,}05$. Exempel ges i de följande punkterna.

38. Normalfördelningen av data kan kontrolleras t.ex. med Kolmogorov-Smirnovs test av anpassningsgraden, kvoten mellan variationsvidden och standardavvikelsen (R/s-testet) eller Shapiro-Wilks test (dubbelsidigt, $p \leq 0{,}05$). Cochrans test, Levenes test eller Bartletts test (dubbelsidigt, $p \leq 0{,}05$) kan användas för att testa varianshomogeniteten. Om förutsättningarna för parametriska testförfaranden (normalitet, varianshomogenitet) är uppfyllda, kan ensidiga variansanalyser (ANOVA) och därpå följande flerjämförelsetester utföras. Multipla jämförelser (t.ex. Dunnetts t-test) eller step-down-grundade trendtester (t.ex. Williams test) kan användas för att beräkna om det finns betydande skillnader ($p \leq 0{,}05$) mellan kontrollerna och de olika testämneskoncentrationerna (välj rekommenderat test i enlighet med OECD:s dokument 54, *Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application*). I annat fall bör icke-parametriska metoder (t.ex. Bonferronis U-test enligt Holm eller Jonckheere-Terpstras trendtest) användas för att bestämma NOEC och LOEC.

Toleranstest

39. Om ett toleranstest (jämförelse av endast ett testkärl och kontrollen) har utförts och de nödvändiga förutsättningarna för parametriska testförfaranden (normalitet, homogenitet) är uppfyllda, kan metriska responser utvärderas med hjälp av Students test (t-test). Om dessa krav inte uppfylls kan man använda t-testet med olika varians (Welchs t-test) eller ett icke-parametriskt test, såsom Mann-Whitneys U-test.

40. För att se om det finns betydande skillnader mellan kontrollerna (kontroll och kontroll med lösningsmedel), kan replikaten för varje kontroll testas enligt beskrivningen för toleranstestet. Om man inte upptäcker betydande

▼M6

skillnader med dessa tester kan alla kontroll- och lösningsmedelskontrollreplikat sammanföras. I annat fall bör alla behandlingar jämföras med lösningsmedelskontrollen.

Testrapport

41. Testrapporten ska innehålla åtminstone följande information:

— *Testkemikalie*

— testkemikaliens identitet, namn, sändnings- och partinummer, CAS-nummer, renhet,

— fysikalisk-kemiska egenskaper (t.ex. log K_{ow}, vattenlöslighet, ångtryck, Henrys konstant (H) och helst information om testkemikaliens omvandling, spridning och fördelning i jord).

— *Testorganismer*

— identifiering av testorganismerna, leverantör, beskrivning av odlingsbetingelserna,

— testorganismernas åldersintervall.

— *Testbetingelser*

— beskrivning av testets utformning och testförfarandet,

— detaljer om testjordens beredning, detaljerade specifikationer om naturjord används (ursprung, historia, partiklarnas storleksfördelning, pH-värde, halt av organiskt material och, om denna uppgift finns tillgänglig, jordens klassificering),

— jordens maximala vattenhållningskapacitet,

— en beskrivning av den teknik som används för att applicera testkemikalien på jorden,

— uppgifter om hjälpkemikalier som används för tillförsel av testkemikalien,

— testkärlens storlek och torrvikten jord per testkärl,

— testbetingelser: ljusintensitet, ljus/mörker-cyklernas varaktighet, temperatur,

— en beskrivning av utfodringsprogrammet, typen och mängden av det foder som används i testet, datum för utfodringen,

— pH-värdet och vattenhalten i jorden vid testets början samt under testets gång (kontroll och varje testkärl),

— detaljerad beskrivning av extraktionsmetoden och extraktionseffektiviteten.

— *Testresultat*

— antalet avkommor som fastställts i varje provkärl vid testets slut,

— antalet adulta honor och de adulta djurens dödlighet (%) i varje provkärl vid testets slut,

— beskrivning av uppenbara symtom eller tydliga beteendeförändringar,

— de resultat som erhållits med referenstestkemikalien,

— sammanfattande statistik (ECx eller NOEC) inklusive 95-procentiga konfidensgränser, och en beskrivning av beräkningsmetoden,

▼M6

— en plott som visar koncentration/responsförhållandet,

— avvikelser från de förfaranden som beskrivs i denna testmetod och ovanliga händelser under testets gång.

LITTERATUR

(1) Casanueva, M. E. (1994). Phylogenetic studies of the free-living and arthropod associated Laelapidae (Acari: Mesostigmata). Gayana Zool. 57, 21–46.

(2) Tenorio, J. M. (1982). Hypoaspidinae (Acari: Gamasida: Laelapidae) of the Hawaiian Islands. Pacific Insects 24, 259–274.

(3) Bakker, F. M., Feije, R., Grove, A. J., Hoogendorn, G., Jacobs, G., Loose, E. D. och van Stratum, P. (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) Karg, W. (1994). Die freilebenden Gamasina (Gamasides), Raubmilben. andra upplagan, i: Dahl, F. (red.): Die Tierwelt Deutschlands, vol. 59, G., Fischer, Jena, s. 523.

(5) Ruf, A. (1991). Do females eat males?: Laboratory studies on the population development of *Hypoaspis aculeifer* (Acari: Parasitiformes). I: F. Dusbabek och V. Bukva (red.): Modern Acarology. Academia Prague & SPD Academic Publishing bv, Haag, vol. 2, 487–492

(6) Ruf, A. (1996). 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) Ruf, A. (1996). Life-history patterns in soil-inhabiting mesostigmatid mites. Proc. IXth Internat. Congr. Acarol. 1994, Columbus, Ohio, s. 621–628.

(8) Krogh, P. H. och Axelsen, J. A. (1998). Test on the predatory mite *Hypoaspis aculeifer* preying on the collembolan *Folsomia fimetaria*. I: Lokke, H. och van Gestel, C. A. M. Handbook of soil invertebrate toxicity tests. John Wiley Sons, Chichester, s. 239–251.

(9) Løkke, H., Janssen, C. R., Lanno, R. P., Römbke J., Rundgren, S. och Van Straalen, N. M. (2002). Soil Toxicity Tests – Invertebrates. I: Test Methods to Determine Hazards of Sparingly Soluble Metal Compounds in Soils. Fairbrother, A., Glazebrook, P. W., van Straalen, N. M. och Tarazona, J. V. (red.). SETAC Press, Pensacola, USA. 128 s.

(10) Schlosser, H.-J. och Riepert, F. (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) Schlosser, H.-J. och Riepert, F. (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) Heckmann, L.-H., Maraldo, K. och Krogh, P. H. (2005). Life stage specific impact of dimethoate on the predatory mite *Hypoaspis aculeifer* Canestrini (Gamasida: Laelapidae). Environmental Science & Technology 39, 7154–7157.

(13) Petersen, H. (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 (Internationella standardiseringsorganisationen) (1994). Markundersökningar – Bestämning av pH, nr 10390. ISO, Genève.

▼M6

(15) Kapitel C.8 i denna bilaga: Toxicitet för daggmaskar.

(16) EPPO (2003): EPPO Standards. Environmental risk assessment scheme for plant protection products. Kapitel 8: Soil Organisms and Functions. Bull. OEPP/EPPO Bull. 33, 195–209.

(17) ISO (Internationella standardiseringsorganisationen) (1995). Markundersökningar – Bestämning av torrsubstans och vattenkvot – Gravimetrisk metod, nr 11465. ISO, Genève.

(18) Fairbrother, A., Glazebrock, P. W., van Straalen, N. M. och Tarazona, J. V. (2002). Test methods to determine hazards of sparingly soluble metal compounds in soils. SETAC Press, Pensacola, FL, USA.

(19) Chi, H. (1981). Die Vermehrungsrate von *Hypoaspis aculeifer* Canestrini (Acarina, Laelapidae) bei Ernährung mit *Onychiurus fimatus* Gisin (Collenbola). Mitt. Dtsch. Ges. allg. angew. Entomol. 3, 122–125.

(20) Schlosser, H. J., och Riepert, F. (1992). Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Bodenraubmilben (Gamasina). Zool. Beitr. N.F. 34:3, 395–433.

(21) Heckmann, L.-H., Ruf, A., Nienstedt, K. M. och Krogh, P. H. 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 denna bilaga: Reproduktionstest för småringmaskar (Enchytraeidae).

(23) ISO (Internationella standardiseringsorganisationen) (1994). Markundersökningar – Föroreningars effekt på daggmaskar (*Eisenia fetida*). Del 2: Bestämning av effekter på reproduktion, nr 11268-2. ISO, Genève.

(24) Southwood, T. R. E. (1991). Ecological methods. With particular reference to the study of insect populations (andra upplagan). Chapman & Hall, London, 524 s.

(25) Dunger, W. och Fiedler, H. J. (1997). Methoden der Bodenbiologie (andra upplagan). G. Fischer, Jena, 539 s.

(26) Lesna, I. och Sabelis, M. W. (1999). Diet-dependent female choice for males with ”good genes” in a soil predatory mite. Nature 401, 581–583.

(27) Ruf, A. (1989). Die Bedeutung von Arrhenotokie und Kannibalismus für die Populationsentwicklung von *Hypoaspis aculeifer* (Canestrini 1883) (Acari, Gamasina). Mitt. Deut. Ges. Allg. Angew. Entomol. 7, 103–107.

(28) Ruf, A. (1994). Die morphologische Variabilität und Fortpflanzungsbiologie der Raubmilbe *Hypoaspis aculeifer* (Canestrini 1883) (Mesostigmata, Dermanyssidae). Avhandling, Universität Bremen.

(29) Ignatowicz, S. (1974). Observations on the biology and development of *Hypoaspis aculeifer* Canestrini, 1885 (Acarina, Gamasides). Zoologica Poloniae 24, 11–59.

(30) Kevan, D. K. McE. och Sharma, G. D. (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 nr 54. ENV/JM/MONO (2006)18

▼M6

Tillägg 1

Definitioner

Följande definitioner gäller för denna testmetod (i detta test uttrycks alla effektkoncentrationer som testkemikaliens vikt per torrvikt testjord):

Kemikalie: ett ämne eller en blandning.

Nolleffektkoncentrationen (NOEC): den koncentration av testkemikalien vid vilken ingen effekt har noterats. I detta test har en halt som motsvarar NOEC ingen statistiskt signifikant effekt ($p < 0,05$) efter en given exponeringstid jämfört med ett kontrollprov.

Lägsta koncentration med observerad effekt (LOEC): den lägsta koncentrationen av testkemikalien som jämfört med ett kontrollprov har en statistiskt signifikant effekt ($p < 0,05$) efter en given exponeringstid.

ECx (koncentration som ger x % effekt): den koncentration som orsakar en x-procentig effekt på testorganismerna efter en given exponeringstid jämfört med ett kontrollprov. EC_{50} är till exempel den koncentration som beräknas ha en effekt för en av testets endpoints på 50 % av en exponerad population under en fastställd exponeringstid.

Testkemikalie: varje ämne eller blandning som testas med denna testmetod.

▼M6

Tillägg 2

Fastställande av jordens maximala vattenhållningskapacitet

Följande metod för att bestämma jordens maximala vattenhållningskapacitet anses vara lämplig. Den beskrivs i bilaga C till ISO DIS 11268-2 (Markundersökningar – Föroreningars effekt på daggmaskar (*Eisenia fetida*) – Del 2: Bestämning av effekter på reproduktion (23)).

Samla in en fastställd kvantitet (t.ex. 5 g) testjordsubstrat med hjälp av en lämplig anordning (jordborr med rör osv.). Täck botten med en bit filterpapper genomdränkt med vatten och placera det därefter på en ställning i ett vattenbad. Röret bör gradvis nedsänkas i vattnet tills vattenytan är ovanför jordytan. Det bör därefter lämnas i vattnet i cirka 3 timmar. Eftersom allt vatten som absorberas av jordens kapillärer inte kan hållas kvar bör jordprovet dräneras i 2 timmar genom att röret placeras på en bädd av mycket fuktig finmald kvartssand i ett slutet kärl (för att förhindra uttorkning). Provet bör sedan torkas till en konstant vikt vid 105 °C och vägas. Vattenhållningskapaciteten (WHC) beräknas enligt följande:

$$\text{WHC (i \% av torrvikten)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

där

S = vattenmättat substrat + rörets vikt + filterpapprets vikt

T = emballagevikt (rörets vikt + filterpapprets vikt)

D = substratets torrvikt

▼M6

Tillägg 3

Bestämning av jordens ph-värde

Följande metod för bestämning av pH-värdet i jord bygger på beskrivningen i ISO DIS 10390: Markundersökningar – Bestämning av pH (16).

En bestämd mängd jord torkas i rumstemperatur i minst 12 timmar. En suspension av jorden (som innehåller minst 5 gram jord) bereds därefter i fem gånger dess volym med antingen 1 M kaliumkloridlösning (KCl) av analyskvalitet eller 0,01 M kalciumkloridlösning ($CaCl_2$) av analyskvalitet. Suspensionen skakas därefter omsorgsfullt i fem minuter och får sedan stå och klarna i minst 2 timmar men högst 24 timmar. Vätskefasens pH mäts sedan med en pH-mätare som har kalibrerats före varje mätning med hjälp av ett antal lämpliga buffertlösningar (t.ex. pH 4,0 och 7,0).

▼M6

Tillägg 4

Uppfödning av *Hypoaspis* (*Geolaelaps*) *aculeifer*, foderkvalster och synkronisering av odlingen

Uppfödning av *Hypoaspis* (*Geolaelaps*) *aculeifer*:

Kulturer kan hållas i plastkärl eller glasburkar fyllda med en blandning av gips och kolpulver i förhållandet 9:1. Gipset kan hållas fuktigt genom att man vid behov tillsätter några droppar destillerat eller avjonat vatten. Uppfödningstemperaturen är optimal mellan 20 ± 2 °C. Ljus-/mörkerförhållandena är inte relevanta för denna art. Bytesdjuren kan vara kvalster av arterna *Tyrophagus putrescentiae* eller *Caloglyphus* sp. (foderkvalster bör hanteras med försiktighet eftersom de kan orsaka allergier hos människor), men rundmaskar, småringmaskar och hoppstjärtar är också lämpliga bytesdjur. Deras ursprung bör anges. Utvecklingen av en population kan börja med en enda hona eftersom hanar utvecklas ur obefruktade ägg. Generationerna är till stor del överlappande. En hona kan leva i över 100 dagar och lägga ungefär 100 ägg under sin livstid. Den maximala äggläggningstakten uppnås mellan 10 och 40 dagar efter att honorna nått adult stadium och uppgår till 2,2 ägg per hona och dygn. Utvecklingstiden från ägg till adult hona är ungefär 20 dagar vid 20 °C. Mer än en kultur bör hållas innan testet påbörjas.

Uppfödning av *Tyrophagus putrescentiae*:

Kvalstren hålls i ett glaskärl fyllt med finmalt bryggerijästpulver. Kärlet bör placeras i en plastspann fylld med KNO_3-lösning för att undvika att kvalstren tar sig ut. Foderkvalstren placeras på pulvrets yta. De blandas sedan noggrant med pulvret (som måste ersättas två gånger i veckan) med hjälp av en spatel.

Synkronisering av kulturen:

Exemplar som används i testet bör ha ungefär samma ålder (ca 7 dagar efter att det adulta stadiet inletts). Vid en uppfödningstemperatur på 20 °C uppnås detta på följande sätt:

Överför honorna till ett rent uppfödningskärl och tillsätt tillräckligt med foder.

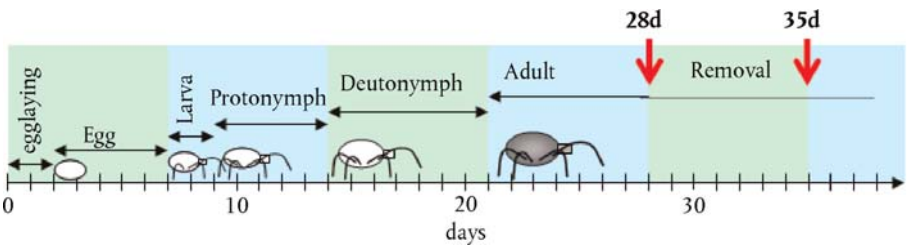
— Låt honorna lägga ägg i 2–3 dagar och avlägsna dem sedan.

— Använd adulta honor för testning mellan den 28:e och 35:e dagen efter att moderdjuren placerats i rena uppfödningskärl.

Adulta honor lätt kan skiljas från hanar och andra utvecklingsstadier genom deras större storlek, svällande form och bruna ryggsköld (hanarna är tunnare och platta). Juvenilerna är vita till gräddfärgade. Utvecklingen av kvalstren vid 20 °C följer ungefär det mönster som beskrivs nedan (figur): ägg (5 dagar), larv (2 dagar), protonymf (5 dagar), deutonymf (7 dagar), honornas förstadium till äggläggning (2 dagar). Därefter är kvalstren adulta.

Figur

Utveckling av Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer vid 20 °C (avlägsnande = honor som används i testet)



▼**M6**

De adulta försöksdjuren avlägsnas från den synkroniserade kulturen och tillförs testkärlen mellan den 28:e och 35:e dagen efter att moderdjuren har börjat lägga ägg (dvs. 7–14 dagar efter att de nått adult stadium). Detta garanterar att försöksdjuren redan har genomgått förstadiet till äggläggningen och har parat sig med hanar som också befinner sig i odlingskärlen. Iakttagelser i laboratoriekulturer visar att honor parar sig omedelbart eller kort efter att de har nått adult stadium om det finns hanar närvarande (Ruf, Vaninnen, egen observation). Perioden på sju dagar har valts för att underlätta integrationen i laboratorierutinerna och för att fungera som en buffert för den utvecklingsmässiga variabiliteten bland enskilda kvalster. Äggläggningen bör inledas med minst samma antal honor som senare krävs i testet (om t.ex. 400 honor behövs i testet bör minst 400 honor tillåtas att lägga ägg i två till tre dagar. Minst 1 200 ägg bör vara utgångspunkten för den synkroniserade populationen (förhållande mellan könen ca 0,5, dödlighet ca 0,2). För att undvika kannibalism är det lämpligare att hålla högst 20–30 äggläggande honor i ett kärl.

▼M6

Tillägg 5

Extraktionsmetoder

För mikroartropoder är värmeextraktion en lämplig metod för att skilja individer från jorden/substratet (se figur nedan). Metoden bygger på organismernas aktivitet, varför endast exemplar som rör sig kommer att kunna registreras. Principen för värmeextraktion är att gradvis försämra villkoren i provet för organismerna så att de lämnar substratet och faller ner i en fixeringsvätska (t.ex. etanol). Viktiga omständigheter är extraktionens varaktighet och skillnaden mellan goda till måttliga till dåliga villkor för organismerna. Extraktionens varaktighet i ekotoxikologiska test måste vara så kort som möjligt, eftersom en populationsökning under tiden då extraktionen pågår skulle förvränga resultaten. Å andra sidan måste temperatur- och fuktbetingelserna i provet alltid befinna sig inom ett intervall som gör det möjligt för kvalstren att röra på sig. Uppvärmning av ett jordprov leder till uttorkning av substratet. Om uttorkningen sker alltför snabbt kan en del kvalster också torka ut innan de hinner fly.

Därför föreslås följande förfarande (24) (25):

Utrustning: tullgrentratt eller jämförbara metoder, t.ex. McFadyen (uppvärmning ovanifrån, provet placeras över en tratt)

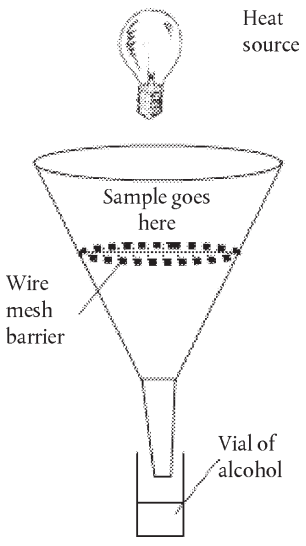
Uppvärmning: 25 °C i 12 timmar, 35 °C i 12 timmar, 45 °C i 24 timmar (totalt 48 timmar). Temperaturen bör mätas i substratet.

Fixeringsvätska: 70 % etanol

Detaljuppgifter: Ta glasbägaren som använts för testet. Avlägsna locket och linda en bit nät eller väv runt öppningen. Väven bör ha en maskstorlek på 1,0–1,5 mm. Fäst väven med ett gummiband. Vänd försiktigt bägaren upp och ner och placera den i extraktionsanordningen. Väven hindrar substratet från att falla ner i fixeringsvätskan men gör det möjligt för kvalstren att lämna provet. Påbörja uppvärmningen efter att alla bägare har placerats i extraktionsanordningen. Avsluta extraktionen efter 48 timmar. Avlägsna bägarna med fixeringsvätska och räkna kvalstren med hjälp av ett dissektionsmikroskop.

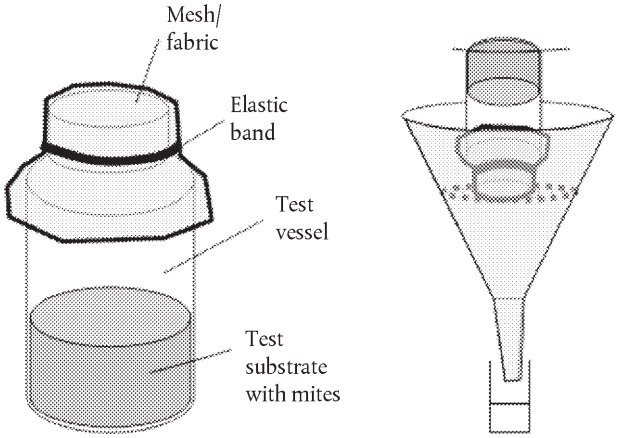
Den valda metodens extraktionseffektivitet måste ha bevisats en eller två gånger per år med hjälp av kärl som innehåller ett känt antal juveniler och adulter som hålls i obehandlade testsubstrat. Effektiviteten bör i genomsnitt vara ≥ 90 % totalt för alla utvecklingsstadier.

Extraktionsanordning av tullgrentyp



▼**M6**

Hur man förbereder testbägaren efter att testet avslutats men före extraktionen



▼M6

Tillägg 6

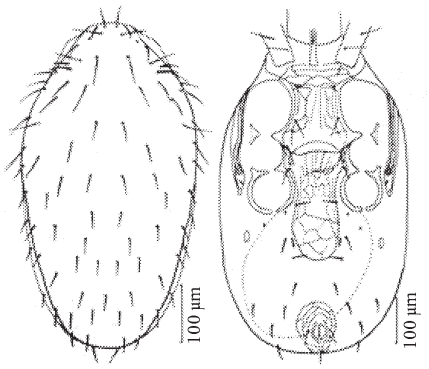
Identifiering av Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer

Underklass/ordning/underordning:	Familj:	Släkte/undersläkte/art:
Kvalster/Parasitiformes/Gamasida	Laelapidae	*Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer*

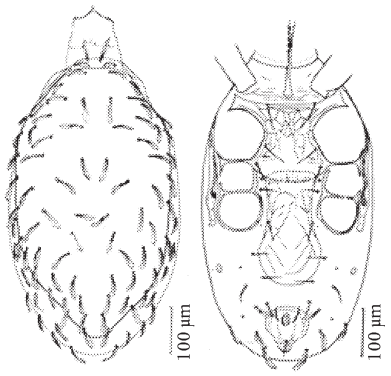
Auktorsnamn och datum:	Fil. dr. F. Faraji (MITOX), 23 januari 2007

Hänvisningar:	Karg, W. (1994). Die freilebenden Gamasina (Gamasides), Raubmilben. Tierwelt Deutschlands 59, andra reviderade upplagan: 1–523. Hughes, A. M. (1976). The mites of stored food and houses. Brittiska jordbruks-, fiskeri- och livsmedelsdepartementet, Technical Bulletin 9: 400 s. Krantz, G. W. (1978). A manual of Acarology. Oregon State University Book Stores, Inc., 509 s.

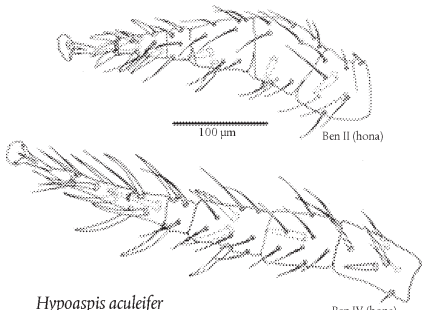
Utmärkande kännetecken:	Tectum med rundad fintandad kant; hypostomfåror med minst sex tänder; kaudala och dorsala borst på Z4 ej särskilt långa; borstformiga dorsala borst; den genitala skölden normal, ej särskilt förstorad och når ej den anala skölden; bakre halvan av ryggskölden saknar parvisa borst; ben II och IV med något tjocka makroborst; dorsala borst Z5 ca två gånger längre än J5; fast digitus på chelicererna med 12–14 tänder och rörligt digitus med två tänder; kroppen (idiosoma) 520–685 µm lång. *Hypoaspis miles* används också inom biologisk bekämpning och kan förväxlas med *H. aculeifer*. Den största skillnaden är: *H. miles* tillhör undersläktet *Cosmolaelaps* och har knivliknande ryggborst medan *H. aculeifer* tillhör undersläktet *Geolaelaps* och har borstformiga ryggborst.



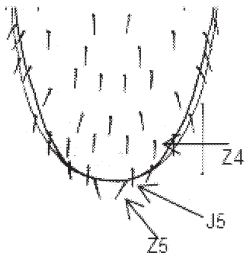
Hypoaspis aculeifer efter Hughes, 1976



Hypoaspis miles efter Hughes, 1976



Hypoaspis aculeifer
Originalteckningar av F. Faraji



Hypoaspis aculeifer,
ryggsköld med karakteristiska borst

▼M6

Tillägg 7

Grundläggande information om biologin hos *Hypoaspis* (*Geolaelaps*) *aculeifer*

Hypoaspis aculeifer tillhör familjen Lealapidae, ordningen kvalster (acari), klassen spindeldjur (arachnida), fylum leddjur (arthropoda). De lever i alla typer av jord och livnär sig på andra kvalster, rundmaskar, småringmaskar och hoppstjärtar (26). Om födobrist uppstår övergår de till kannibalism (27). Rovkvalstren består av kropp (idiosoma) och huvudsköld (gnathosoma). Kroppen (idiosoma) saknar tydlig differentiering mellan prosoma (huvudet) och opisthosoma (buken). Huvudskölden innehåller mundelar såsom palper och chelicerer. Chelicererna är tredelade och försedda med tänder av olika former. Hanarna använder sina chelicerer delvis för intag av föda, men huvudsakligen för att överföra spermatoforer till honorna. En ryggsköld täcker nästan hela kroppen (idiosoma). En stor del av honornas kropp utgörs av reproduktionsorganen, som är särskilt framträdande strax innan äggläggningen. På buksidan återfinns två sköldar, den bakre och den genitala skölden. Alla ben har borst och taggar. Borsten används för att förankra kvalstren när de rör sig i jord eller ovanpå jordytan. Det första benparet används främst som antenner. Det andra benparet används inte bara för förflyttning utan även för att hålla fast bytesdjuren. Taggarna på det fjärde benparet kan fungera både som skydd och som ”framdrivande motor” (28). Hanarna är 0,55–0,65 mm långa och väger 10–15 µg. Honorna är 0,8–0,9 mm långa och väger 50–60 µg (8) (28) (figur 1).

Figur 1

hona, hane, protonymf och larv av *H. aculeifer*.



Vid 23 °C blir kvalstren könsmogna efter 16 dagar (honor) respektive 18 dagar (hanar) (6). Honorna överför sperman via könsöppningar (solenostom) till ovarierna. I ovarierna lagras och mognar sperman. Befruktningen sker endast efter att spermierna har mognat i ovarierna. De befruktade eller obefruktade äggen läggs i klumpar eller enskilt, helst i springor eller hål. Honor som parat sig kan få avkomma av båda könen, men ägg från oparade honor ger endast upphov till hanar. Under utvecklingen till adulter genomgår kvalstren fyra utvecklingsstadier (ägg–larv, larv–protonymf, protonymf–deutonymf, deutonymf–adult).

Äggen är mjölkvita, genomskinliga, elliptiska och cirka 0,37 mm långa med ett fast ytterhölje. Larverna är mellan 0,42 och 0,45 mm långa (8). De har endast tre par ben. I huvudregionen utvecklas palper och chelicerer. Chelicerna, som har ett fåtal småtänder, används vid kläckningen. Efter den första skalömsningen, 1–2 dagar efter kläckningen, utvecklas protonymferna. De är också vita, storleken är

▼**M6**

0,45–0,62 mm (8) och de har fyra benpar. Chelicererna har nu alla sina tänder. Från och med detta stadium börjar kvalstren söka efter föda. Bytesdjurens yttre hinna genomborras då med chelicererna och ett matsmältningssekret sprutas in i bytesdjuren. Den delvis smälta födan kan sedan sugas upp av kvalstret. Chelicererna kan också användas till att riva loss större foderpartiklar från foderklumpar (28). Efter ytterligare en skalömsning utvecklas deutonymferna. De är 0,60–0,80 mm (8) i storlek och gula till ljusbruna i färgen. Från och med denna fas kan honorna differentieras från hanarna. Efter ytterligare en hudömsning, under vilken djuren är inaktiva och den bruna skölden utvecklas (efter cirka 14 dagar), har kvalstren nått adult stadium (28) (29) (30). Deras livslängd är mellan 48 och 100 dagar vid 25 °C (27).

▼M6

Tillägg 8

Sammanfattning och tidsplan för de viktigaste åtgärderna som ska vidtas för att utföra Hypoaspis-testet

Tid (dagar)testets början = dag 0	Åtgärd/uppgift
Dag – 35 till – 28	Flytta honor från stamkulturerna till rengjorda kärl för att inleda synkroniseringen Två dagar senare: honorna avlägsnas Två eller tre gånger i veckan: ge djuren tillräckligt med foder
Dag – 5 (+/– 2)	Bered den syntetiska jorden
Dag – 4 (+/– 2)	Bestäm den syntetiska jordens vattenhållningskapacitet (WHC) Låt torka över natten Följande dag: väg proverna och beräkna vattenhållningskapaciteten
Dag – 4 (+/– 2)	Förhandsfukta den syntetiska jorden för att uppnå 20–30 % av vattenhållningskapaciteten
Dag 0	Inled testet: tillsätt testkemikalien till den syntetiska jorden Inför tio honor i varje replikat Väg varje replikat Inrätta abiotiska kontroller för fukthalten och pH-värdet, två replikat per testkärl Låt fuktkontrollerna torka över natten Följande dag: väg fuktkontrollerna Följande dag: mät pH-värdet i de uttorkade abiotiska kontrollerna
Dag 3, 6, 9, 12 (ungefär)	Förse varje replikat med en tillräcklig mängd bytesorganismer Väg varje replikat och tillsätt därefter förångat vatten
Dag 14	Avsluta testet, anordna extraktion med alla replikat plus extraktionseffektivitetskontroller Låt vattenhaltkontrollerna torka över natten Följande dag: väg vattenhaltkontrollerna Följande dag: mät pH-värdet i de uttorkade kontrollerna
Dag 16	Avsluta extraktionen
Dag 16 +	Registrera antalet adulter och juveniler i det extraherade materialet Rapportera resultaten i malltabeller Rapportera testförfarandet på testprotokollblanketter.

▼M6

C.37 21-DAGARS TEST PÅ FISK: EN KORTSIKTIG SCREENING FÖR ÄMNEN MED ÖSTROGEN OCH ANDROGEN AKTIVITET SAMT AROMATASHÄMMANDE VERKAN

INLEDNING

1. Denna testmetod motsvarar OECD:s testriktlinje (TG) 230 (2009). Behovet av att utveckla och validera ett test på fisk som kan påvisa vissa endokrint aktiva kemikalier härrör från farhågor att koncentrationen av kemikalier i miljön kan orsaka negativa effekter både hos människor och vilda djur på grund av samspelet mellan dessa kemikalier och det endokrina systemet. OECD inledde 1998 en högprioriterad verksamhet för att se över befintliga riktlinjer och utveckla nya riktlinjer för undersökning och testning av potentiellt endokrinstörande ämnen. Ett inslag i verksamheten var att utveckla en testmetod för undersökning av kemikalier som är verksamma på det endokrina systemet hos fiskarter. Det 21 dagar långa endokrina screeningtestet på fisk genomgick ett omfattande valideringsprogram bestående av interlaborativa studier med utvalda kemikalier för att demonstrera testets relevans och tillförlitlighet för påvisning av östrogen- och aromatashämmande kemikalier (1) (2) (3) (4) (5) hos de tre undersökta fiskarterna (knölskallelöja, japansk risfisk och sebrafisk). Påvisning av androgen verksamhet är möjlig i knölskallelöja och japansk risfisk, men inte hos sebrafisk. Det går inte att påvisa antiandrogena kemikalier med denna testmetod. Valideringen har fackgranskats av en panel av experter utsedda av de nationella samordnarna för programmet för testriktlinjer (Test Guideline Programme) (6). Testet är inte utformat för att upptäcka särskilda hormonstörande mekanismer eftersom försöksdjuren har en intakt hypotalamus-hypofys-gonad-axel (HPG-axel), som kan reagera på kemikalier som påverkar HPG-axeln på olika nivåer. Det kortvariga reproduktionstestet på fisk (OECD TG 229) inkluderar fruktsamhet och, när så är lämpligt, histopatologiska undersökningar av könskörtlarna hos knölskallelöja, samt alla endpoints som ingår i denna testmetod. OECD TG 229 tillhandahåller en screening av kemikalier som påverkar fortplantningen genom olika mekanismer, bland annat endokrina modaliteter. Detta bör beaktas innan den lämpligaste testmetoden väljs ut.

2. Denna metod beskriver ett screeningtest in vivo där könsmogna lekande hanar och honor hålls tillsammans och exponeras för en kemikalie under en begränsad del av deras livscykel (21 dagar). Vid slutet av den 21 dagar långa exponeringstiden, beroende på den art som används, mäts en eller två biomarkörer som endpoints hos hanar och honor som indikatorer på testkemikaliens östrogena aromatashämning eller androgena aktivitet. Dessa endpoints är vitellogenin och sekundära könskaraktärer. Vitellogenin mäts hos knölskallelöja, japansk risfisk och sebrafisk, medan de sekundära könskaraktärerna endast mäts hos knölskallelöja och japansk risfisk.

3. Detta biologiska test fungerar som ett screeningtest in vivo av vissa endokrina verkningsmekanismer och dess tillämpning bör ses mot bakgrund av *OECD Conceptual Framework for the Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals* (28).

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN OCH BEGRÄNSNINGAR

4. Vitellogenin produceras vanligen i levern hos honor av ägglägganде ryggradsdjur som respons på cirkulerande endogent östrogen. Det är en prekursor till ägguleproteiner, och när det väl har producerats i levern förs det med blodet till äggstockarna, där det tas upp och modifieras av ägg som är under utveckling. Vitellogenin är nästan inte påvisbart i plasman hos icke könsmogna hon- och hanfiskar eftersom de saknar tillräckliga halter av cirkulerande östrogen. Levern kan dock bilda och utsöndra vitellogenin som respons på exogen östrogenstimulans.

▼M6

5. Mätningen av vitellogenin gör det möjligt att påvisa kemikalier med olika östrogena verkningsmekanismer. Man kan påvisa ämnen med östrogena kemikalier genom mätning av vitellogenininduktionen hos hanfiskar, och detta har dokumenterats många gånger i den fackgranskade vetenskapliga litteraturen (t.ex. (7)). Vitellogenininduktion har också påvisats efter exponering för aromatiserbara androgener (8, 9). En minskning av nivåerna av cirkulerande östrogen hos honor, till exempel genom hämning av aromatas som omvandlar det endogena androgenet till det naturliga östrogenet 17-beta-östradiol, orsakar en minskning av vitellogeninkoncentrationen, som används för att påvisa kemikalier med aromatashämmande egenskaper (10, 11). Den biologiska relevansen av den vitellogeninrespons som följer östrogen hämning och aromatashämning har fastställts och har dokumenterats i stora drag. Det är dock möjligt att produktionen av VTG hos honor även kan påverkas av allmän toxicitet och icke-endokrina toxiska verkningsmekanismer, t.ex. hepatotoxicitet.

6. Flera mätmetoder har framgångsrikt utvecklats och standardiserats för rutinmässig användning. Detta gäller artspecifika testmetoder för ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) som använder immunokemiska tekniker för kvantifiering av det vitellogenin som producerats i små blod- eller leverprover som insamlats från enskilda fiskar (12, 13, 14, 15, 16, 17, 18). Prov tas på blod från knölskallelöja, blod eller huvud/stjärthomogenat från sebrafisk och lever från risfisk för mätning av VTG. Hos risfisk finns det en god korrelation mellan VTG mätt i blod och i leverprover (19). Tillägg 6 innehåller rekommenderade förfaranden för provtagning för analys av vitellogenin. Utrustning för mätning av vitellogenin är lätt att få tag på. Denna utrustning bör bygga på en validerad artspecifik ELISA-metod.

7. De sekundära könskaraktärerna hos hanarna av vissa fiskarter är externt synliga, kvantifierbara och mottagliga för cirkulerande nivåer av endogena androgener. Detta är fallet för knölskallelöja och risfisk, men inte för sebrafisk, som inte har några kvantifierbara sekundära könskaraktärer. Honor behåller förmågan att utveckla sekundära hanliga könskaraktärer om de exponeras för androgena kemikalier i vattnet. Flera studier finns tillgängliga i den vetenskapliga litteraturen som dokumenterar denna typ av respons hos knölskallelöja (20) och risfisk (21). En minskning av de sekundära könskaraktärerna hos hanar bör tolkas med försiktighet på grund av dålig statistisk giltighet, och bör i stället bygga på en expertbedömning och på vikten av de sammanlagda bevisen. Möjligheten att använda sebrafisk i detta test är begränsad, eftersom dessa fiskar inte har några kvantifierbara sekundära könskaraktärer som är mottagliga för androgena kemikalier.

8. Hos knölskallelöja är den viktigaste indikatorn på exogen exponering för androgener antalet parningstuberkler på honornas nosar. Hos risfisk utgör antalet papillära utväxter det huvudsakliga kännetecknet hos honor för exogen exponering för androgena kemikalier. I tilläggen 5A och 5B anges rekommenderade förfaranden som bör följas vid utvärdering av könskaraktärerna hos knölskallelöja och risfisk.

9. Definitioner som används i denna testmetod finns i tillägg 1.

PRINCIP FÖR TESTMETODEN

10. Med denna metod exponeras han- och honfiskar som befinner sig i ett reproduktivt tillstånd tillsammans i testkärlen. Deras status som vuxna djur som befinner sig i ett reproduktionsstadium innebär att könen är tydligt särskiljbara och att de är mottagliga för exogena kemikalier, och därmed kan man göra en könsrelaterad analys av varje endpoint. Vid slutet av testet

▼M6

bekräftas könet med hjälp av makroskopisk undersökning av könskörtlarna efter att buken öppnats ventralt med sax. En översikt över de relevanta betingelserna för ett biologiskt test återfinns i tillägg 2. Testet inleds normalt med fisk som tagits från en population som befinner sig i lekstadium. Åldrade djur bör inte användas. Vägledning om fiskarnas ålder och reproduktiva status finns i avsnittet om urval av fisk. Testet genomförs med tre kemiska exponeringskoncentrationer och en vattenkontroll, och vid behov en lösningsmedelskontroll. Två kärl eller replikat per behandling används för risfisk och sebrafisk (varje kärl innehåller fem hanar och fem honor), medan fyra kärl eller replikat per behandling används för knölskallelöja (varje kärl innehåller två hanar och fyra honor). Detta är för att tillgodose knölskallelöjhanens territoriella beteende samtidigt som testets statistiska styrka upprätthålls. Exponeringens varaktighet är 21 dagar, och provtagningen på fiskarna sker på dag 21 av exponeringen.

11. Vid provtagningen på dag 21 avlivas alla djuren på ett humant sätt. De sekundära könskaraktärerna mäts hos knölskallelöja och risfisk (se tillägg 5A och 5B), blodprov tas för bestämning av vitellogenin hos sebrafisk och knölskallelöja eller huvud/stjärt samlas in för bestämning av vitellogenin hos sebrafisk (tillägg 6), och levern samlas in för VTG-analys hos risfisk (tillägg 6).

KRITERIER FÖR GODKÄNNANDE AV TESTET

12. För att testresultaten ska kunna godtas måste följande villkor uppfyllas:

— Mortaliteten i vatten- eller lösningsmedelskontrollen bör inte överstiga 10 % i slutet av exponeringsperioden.

— Halten av löst syre bör vara minst 60 % av luftmättnadsvärdet (ASV) under hela exponeringsperioden.

— Vattentemperaturen bör inte vid någon tidpunkt under exponeringsperioden variera med mer än ± 1,5 °C mellan olika testkärl, och får variera med högst 2 °C från de temperaturgränser som specificerats för den art som används i testet (se tillägg 2).

— Bevis bör finnas tillgängliga som visar att koncentrationen av testkemikalien i lösningen på ett tillfredsställande sätt har hållits inom ± 20 % av de genomsnittliga uppmätta värdena.

BESKRIVNING AV TESTMETODEN

Utrustning

13. Normal laboratorieutrustning, och särskilt

(a) syrgas- och pH-mätare,

(b) utrustning för bestämning av vattnets hårdhet och alkalinitet,

(c) lämplig utrustning för temperaturreglering, helst med kontinuerlig övervakning,

(d) akvarier tillverkade av kemiskt inert material och tillräckligt stora för den rekommenderade fisk- och antalstätheten (se tillägg 2),

(e) leksubstrat för knölskallelöja och sebrafisk (tillägg 4 innehåller de uppgifter som behövs),

(f) lämplig precisionsvåg (t.ex. noggrannhet ± 0,5 mg).

▼M6

Vatten

14. Allt vatten i vilket testarten uppvisar lämplig överlevnad och tillväxt kan användas som testvatten. Vattnet ska hålla jämn kvalitet under hela testperioden. Vattnets pH bör ligga inom intervallet 6,5–8,5 men får dock under ett givet test variera med högst ± 0,5 pH-enheter. För att säkerställa att utspädningsvattnet inte påverkar testresultaten på oönskat sätt (t.ex. genom komplexbildning med testkemikalien) bör vattenprover tas regelbundet för analys. Mätningar av tungmetaller (t.ex. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd och Ni), viktiga anjoner och katjoner (t.ex. Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-} och SO_4^{2-}), bekämpningsmedel (t.ex. total mängd organiska fosforföreningar eller total mängd organiska klorföreningar), halten organiskt kol och uppslammade partiklar bör göras t.ex. var tredje månad i fall där man vet att utspädningsvattnet håller en relativt jämn kvalitet. Om vattenkvaliteten har visat sig vara jämn under minst ett år kan dessa kontroller göras med längre intervaller (t.ex. var sjätte månad). Några kemiska egenskaper för godtagbart utspädningsvatten anges i tillägg 3.

Testlösningar

15. Testlösningar med de valda koncentrationerna bereds genom utspädning av en stamlösning. Stamlösningen bör helst beredas genom att man helt enkelt blandar eller skakar testkemikalien i utspädningsvattnet på mekanisk väg (t.ex. omrörning eller ultraljud). Mättnadskolonner (löslighetskolonner) kan användas för att få en stamlösning med lämplig koncentration. Användning av lösningsmedel som bärämne rekommenderas inte. Om ett lösningsmedel måste användas kan man dock inrätta en lösningsmedelskontroll som testas parallellt med samma lösningsmedelskoncentration som i de kemiska behandlingarna. För kemikalier som är svåra att testa kan lösningsmedel tekniskt sett vara den bästa lösningen. OECD:s vägledningsdokument om akvatisk toxicitetstestning av svåra ämnen och blandningar bör konsulteras i sådana fall (22). Valet av lösningsmedel avgörs av testkemikaliens kemiska egenskaper. OECD:s vägledningsdokument rekommenderar högst 100 µl/l, en rekommendation som bör iakttas. En färsk undersökning (23) visade dock på ytterligare problem vid användning av lösningsmedel när man testar för endokrin aktivitet. Det rekommenderas därför att koncentrationen av ett eventuellt lösningsmedel begränsas till ett minimum om det är tekniskt genomförbart (beroende på testkemikaliens fysikalisk-kemiska egenskaper).

16. Ett genomflödestestsystem ska användas. Ett sådant system portionerar och späder kontinuerligt ut en stamlösning av testkemikalien (t.ex. med mätpump, proportionalitetslösningssystem och mättnadskärlsystem) för att tillföra en serie koncentrationer till testbehållarna. Stamlösningens och utspädningsvattnets flödeshastighet bör kontrolleras regelbundet under testets gång, helst dagligen, och får inte variera med mer än 10 % under hela testet. Man bör vara noga med att undvika att använda plaströr av låg kvalitet eller andra material som kan innehålla biologiskt aktiva kemikalier. Vid val av materialet för genomflödessystemet bör man beakta möjligheten att testkemikalien eventuellt kan adsorberas till detta material.

Fiskhållning

17. Testfiskarna ska tas från en laboratoriepopulation från en enda stam som under minst två veckor före testets början har acklimatiserats för testet genom att hållas i vatten med samma kvalitet och ljusförhållanden som det som används i testet. Det är viktigt att fisk- och antalstätheten (för definitioner, se tillägg 1) anpassas för de arter som testas (se tillägg 2).

18. Efter en anpassningsperiod på 48 timmar ska mortaliteten registreras och följande kriterier tillämpas:

▼M6

— Om mortaliteten under sju dagar är högre än 10 % av populationen ska hela partiet förkastas.

— Om mortaliteten ligger mellan 5 och 10 % av populationen fortsätts acklimatiseringen under ytterligare sju dagar. Om mer än 5 % av populationen har dött under den andra sjudagarsperioden ska hela partiet förkastas.

— Om mortaliteten under sju dagar är lägre än 5 % av populationen ska partiet godtas.

19. Fiskarna bör inte ges någon behandling mot sjukdomar under acklimatiseringsperioden, under förexponeringen, eller under exponeringsperioden.

Förexponering och urval av fisk

20. En veckolång förexponeringsperiod rekommenderas då djuren placeras i kärl som liknar de som används i det verkliga testet. Fiskarna bör utfodras ad libitum under hela hållningsperioden och under exponeringsfasen. Exponeringen inleds med sexuellt dimorf vuxen fisk från en laboratoriesamling med könsmogna djur (t.ex. med tydligt synbara sekundära könskaraktärer när det gäller knölskallelöja och risfisk) som aktivt leker. För allmän vägledning (detta bör inte betraktas isolerat från observationer av ett fiskbestånds faktiska reproduktiva status), bör knölskallelöjorna vara ungefär 20 (± 2) veckor gamla, förutsatt att de har odlats vid en temperatur på 25 ± 2 °C under hela deras livstid. Japanska risfiskar bör vara ungefär 16 (± 2) veckor, förutsatt att de har odlats vid en temperatur på 25 ± 2 °C under hela deras livstid. Sebrafiskar bör vara ungefär 16 (± 2) veckor, förutsatt att de har odlats vid en temperatur på 26 ± 2 °C under hela deras livstid.

TESTETS UTFORMNING

21. Tre koncentrationer av testkemikalien, en kontroll (vatten) och, vid behov, en lösningsmedelskontroll används. Uppgifterna kan analyseras för att fastställa statistiskt signifikanta skillnader mellan responsen i behandlingarna och i kontrollen. Dessa analyser kommer att klargöra huruvida ytterligare testning av mer långsiktiga negativa effekter (dvs. överlevnad, utveckling, tillväxt och reproduktion) krävs för kemikalien, snarare än att de används för riskbedömning (24).

22. För sebrafisk och risfisk undersöks på testdag 21 hanar och honor från varje behandlingsnivå (fem hanar och fem honor i vart och ett av de två replikaten) och från kontrollgruppen eller -grupperna för mätning av vitellogenin och sekundära könskaraktärer, i tillämpliga fall. För knölskallelöja undersöks på dag 21 av exponeringen hanar och honor (två hanar och fyra honor i vart och ett av de fyra replikaten) och från kontrollgruppen eller -grupperna för mätning av vitellogenin och sekundära könskaraktärer.

Val av testkoncentrationer

23. Vid utförandet av detta test bör den högsta testkoncentrationen fastställas utifrån den högsta tolererade koncentrationen (MTC), vilken bestäms på grundval av ett preliminärt test eller andra uppgifter om toxicitet, eller 10 mg/l, eller högsta löslighet i vatten, beroende på vilket som är lägst. MTC definieras som den högsta testade koncentrationen av testkemikalien som leder till mindre än 10 % mortalitet. Denna metod förutsätter att det finns empiriska uppgifter om akut toxicitet eller toxikologiska uppgifter utifrån vilka MTC kan uppskattas. Uppskattningar av MTC-koncentrationen kan vara otillförlitliga och kräver vanligen ett visst mått av fackmässigt omdöme.

▼M6

24. För detta krävs tre testkoncentrationer som skiljer sig åt med en konstant faktor som inte överstiger 10 och en kontroll med utspädningsvatten (och en lösningsmedelskontroll vid behov). Ett intervall för spridningsfaktorer på mellan 3,2 och 10 rekommenderas.

FÖRFARANDE

Val och vägning av testfiskarna

25. Det är viktigt att minimera fiskarnas variationer i vikt vid början av testet. I tillägg 2 anges lämpliga storleksintervall för de arter som rekommenderas för användning i detta test. För hela det fiskbestånd som används i testet bör variationen mellan individernas vikt för hanar och honor vid testets början om möjligt hållas inom ± 20 % av den aritmetiska medelvikten för samma kön. Det rekommenderas att ett delprov av fiskbeståndet vägs före testet i syfte att uppskatta medelvikten.

Exponeringsförhållanden

Varaktighet

26. Testperiodens längd är 21 dagar efter en förexponeringsperiod. Den rekommenderade förexponeringsperioden är en vecka.

Utfodring

27. Fiskarna bör utfodras ad libitum med lämpligt foder (tillägg 2) i tillräcklig mängd för att upprätthålla kroppskonditionen. Det är viktigt att se till att det inte uppstår mikrobtillväxt eller att vattnet blir grumligt. Som en allmän vägledning kan sägas att den dagliga fodergivan kan delas upp i två eller tre lika stora delar för flera utfodringstillfällen per dag, med minst tre timmar mellan varje utfodring. Det kan vara godtagbart med en enda större giva, särskilt under veckosluten. Fiskarna ska inte ges något foder under de tolv timmar som föregår provtagningen/obduktionen.

28. Fiskfodret bör utvärderas med avseende på förekomst av föroreningar såsom bekämpningsmedel som innehåller organiska klorföreningar, polycykliska aromatiska kolväten (PAH) och polyklorerade bifenyler (PCB). Man bör undvika att ge foder som har en hög nivå av fytoöstrogener som kan äventyra testresponsen för kända östrogenagonister (t.ex. 17-beta-östradiol).

29. Oätet foder och fekalt material ska avlägsnas från testkärlen minst två gånger i veckan, t.ex. genom omsorgsfull rengöring av akvariets botten med hjälp av en hävert.

Ljus och temperatur

30. Fotoperioden och vattentemperaturen bör vara anpassade efter den art som testas (se tillägg 2).

Frekvens för analytiska bestämningar och mätningar

31. Innan exponeringstiden inleds bör man se till att det kemiska tillsatssystemet fungerar på lämpligt sätt. Alla nödvändiga analysmetoder bör fastställas, och man bör ha tillräckliga kunskaper om den kemiska stabiliteten i testsystemet. Under testets gång bestäms testkemikaliens koncentrationer med jämna mellanrum, enligt följande: flödeshastigheten för stamlösningarna med utspädnings- och testämne bör helst kontrolleras dagligen men minst två gånger per vecka, och bör inte variera med mer än 10 % genom hela testet. Det rekommenderas att de faktiska testkoncentrationerna mäts i samtliga kärl vid testets början och därefter varje vecka.

32. Det rekommenderas att resultaten baseras på de uppmätta koncentrationerna. Om koncentrationen av testkemikalien i lösningen på ett tillfredsställande sätt har hållits inom ± 20 % av den nominella koncentrationen under hela testperioden kan resultaten baseras antingen på nominella eller på uppmätta värden.

33. Proverna kan behöva filtreras (t.ex. genom porstorlek 0,45 μm) eller centrifugeras. I sådana fall rekommenderas centrifugering. Om testmaterialet inte adsorberas på filter kan dock även filtrering godtas.

▼M6

34. Under testet bör halten löst syre, temperaturen och pH-värdet mätas i samtliga kärl minst en gång per vecka. Den totala hårdheten och alkaliniteten bör mätas i kontrollerna och i ett kärl med den högsta koncentrationen minst en gång per vecka. Temperaturen ska helst övervakas kontinuerligt i minst ett testkärl.

Observationer

35. Ett antal allmänna (t.ex. överlevnad) och grundläggande biologiska responser (t.ex. vitellogeninnivåer) bedöms under testets gång eller vid testets slut. Mätningen och utvärderingen av dessa endpoints och deras användbarhet beskrivs nedan.

Överlevnad

36. Fiskarna bör undersökas en gång per dag under testperioden. All mortalitet bör registreras, och döda fiskar bör avlägsnas så snart som möjligt. Döda fiskar ska inte ersättas, vare sig i kontrollerna eller behandlingskärlen. Könet på de fiskar som dött under testet bör fastställas genom makroskopisk utvärdering av könskörtlarna.

Beteende och utseende

37. Allt onormalt beteende (i jämförelse med kontrollerna) ska registreras. Detta kan omfatta tecken på allmän toxicitet, inklusive hyperventilering, okoordinerat simbeteende, förlust av balansen och atypisk passivitet eller atypiskt ätbeteende. Dessutom bör yttre abnormiteter (t.ex. blödningar eller missfärgning) noteras. Sådana tecken på toxicitet bör övervägas noga vid tolkningen av data eftersom de kan vara tecken på koncentrationer vid vilka biomarkörerna för endokrin aktivitet inte är tillförlitliga. Sådana observationer rörande beteendet kan också ge kvalitativ information som påverkar framtida krav för test på fisk. Till exempel har territoriell aggressivitet observerats hos normala hanar och maskuliniserade honor av knölskallelöja under exponering för androgener, och för sebrafiskar har det typiska parnings- och romläggningsbeteendet efter ljusperiodens början vid gryningen reducerats eller fördröjts på grund av exponering för östrogener eller antiandrogener.

38. Eftersom vissa aspekter av utseendet (huvudsakligen färgen) snabbt kan ändras vid hantering är det viktigt att kvalitativa iakttagelser görs innan djuren avlägsnas från testsystemet. Erfarenheterna hittills med knölskallelöja tyder på att vissa endokrint aktiva kemikalier kan till en början åstadkomma förändringar av följande yttre egenskaper: kroppsfärg (ljus eller mörk), färgmönster (förekomst av vertikala strimmor) och kroppsform (huvudet och bröstpartiet). Därför bör observationer av fiskarnas fysiska utseende göras under testets gång och vid studiens slut.

Human avlivning av fisk

39. På dag 21, dvs. vid slutet av exponeringen, bör fiskarna avlivas med lämpliga mängder trikain (trikainmetansulfonat, metakain, MS-222 (CAS-nr 886-86-2), 100–500 mg/l buffrat med 300 mg/l $NaHCO_3$ (natriumvätekarbonat, CAS-nr 144-55-8) för att minska irritationen på slemhinnorna. Prov tas sedan på blod eller vävnad för bestämning av vitellogenin, så som förklarades i avsnittet om vitellogenin.

▼M6

Observation av sekundära könskaraktärer

40. Vissa endokrint aktiva kemikalier kan medföra förändringar i särskilda sekundära könskaraktärer (antal parningstuberkler hos knölskallelöjhanar, papillära utväxter hos risfiskhanar). Framför allt kan kemikalier med vissa verkningsmekanismer ge upphov till en onormal förekomst av sekundära könskaraktärer hos djur av det motsatta könet. Till exempel kan agonister som påverkar androgenreceptorer, såsom trenbolon, metyltestosteron och dihydrotestosteron, göra så att honor av knölskallelöja utvecklar tydliga parningstuberkler och att risfiskhonor utvecklar papillära utväxter (11, 20, 21). Det har också rapporterats att agonister som påverkar östrogenreceptorer kan minska antalet parningstuberkler och storleken på den dorsala nackvalken hos vuxna hanar (25, 26). Sådana makromorfologiska iakttagelser kan ge användbar kvalitativ och kvantitativ information som kan påverka eventuella framtida krav för test på fisk. Antalet och storleken på parningstuberklerna hos knölskallelöja och de papillära utväxterna hos risfiskar kan mätas direkt eller mer praktiskt på konserverade exemplar. Rekommenderade förfaranden för utvärdering av sekundära könskaraktärer hos knölskallelöja och risfisk finns i bilaga 5A respektive 5B.

Vitellogenin (VTG)

41. Blod samlas in från den kaudala artären/venen med ett hepariniserat mikrohematokrit-centrifugerat kapillärrör, eller alternativt genom hjärtpunktering med en spruta. Beroende på fiskens storlek kan man i allmänhet samla in mellan 5–60 µl blod per individ för knölskallelöja, och 5–15 µl per individ för sebrafisk. Plasman avskiljs från blodet genom centrifugering och lagras med proteashämmare vid – 80 °C tills de analyseras med avseende på vitellogenin. Alternativt använder man levern hos risfiskar, och för sebrafiskar kan huvud/stjärthomogenatet användas som vävnadskälla för bestämning av vitellogenin (tillägg 6). Mätningen av VTG bör baseras på en validerad homolog ELISA-metod med användning av en homolog VTG-standard och homologa antikroppar. Det rekommenderas att man använder en metod som kan påvisa VTG-nivåer som är så låga som ett fåtal ng/ml plasma (eller ng/mg vävnad), vilket är bakgrundsnivån hos oexponerade hanfiskar.

42. Kvalitetskontrollen av vitellogeninanalysen genomförs med hjälp av standarder, blankprov och analys av minst två replikat. För varje ELISA-metod bör ett test för matriseffekt (effekten av provutspädning) genomföras för att bestämma den minsta utspädningsfaktorn för proven. Varje ELISA-platta som används för VTG-tester bör omfatta följande kvalitetskontrollprov: minst sex kalibreringsstandarder som täcker intervallet för de väntade vitellogeninkoncentrationerna, och minst ett icke-specifikt blankprov för bindningsbestämning (som analyseras i två exemplar). Absorbansen i dessa blankprov bör vara mindre än 5 % av den högsta absorbansen i kalibreringsstandarderna. Minst två alikvoter (brunnsduplikat) av varje provutspädning analyseras. Brunnsduplikat som avviker med mer än 20 % bör analyseras på nytt.

43. Korrelationskoefficienten (R^2) för kalibreringskurvor ska vara högre än 0,99. En hög korrelation är dock inte tillräckligt för att garantera en adekvat prediktion av koncentrationerna inom alla intervaller. Förutom att kalibreringskurvan har en tillräckligt hög korrelationsgrad bör koncentrationen för varje standard, som beräknats utifrån kalibreringskurvan, ligga på mellan 70 och 120 % av dess nominella koncentration. Om de nominella koncentrationerna tenderar att avvika från kalibreringens regressionslinje (t.ex. vid lägre

▼M6

koncentrationer) kan det vara nödvändigt att dela upp kalibreringskurvan i låga respektive höga intervaller eller att använda en icke-linjär modell som gör att absorbansdata kan passas in på ett lämpligt sätt. Om kurvan delas upp bör $R^2 > 0,99$ gälla för båda linjesegmenten.

44. Detektionsgränsen (LOD) definieras som koncentrationen i den lägsta analytiska standarden, och kvantifieringsgränsen (LOQ) definieras som koncentrationen i den lägsta analytiska standarden multiplicerad med den lägsta utspädningsfaktorn.

45. Varje dag som vitellogenintester utförs ska ett berikningsprov analyseras som beretts med en referensstandard för tester (inter-assay) (tillägg 7). Förhållandet mellan den förväntade koncentrationen och den uppmätta koncentrationen rapporteras tillsammans med resultaten från varje försöksomgång som utförs på samma dag.

DATA OCH RAPPORTERING

Utvärdering av biomarkörresponser med variansanalys (ANOVA)

46. För att identifiera en kemikalies potentiella endokrina aktivitet jämförs responser mellan behandlings- och kontrollgrupperna med hjälp av variansanalys (ANOVA). Om en lösningsmedelskontroll används bör ett lämpligt statistiskt test utföras mellan utspädningsvatten- och lösningsmedelskontrollerna för varje endpoint. Vägledning om hur man ska hantera data rörande utspädningsvatten- och lösningsmedelskontrollerna i den efterföljande statistiska analysen finns i OECD, 2006c (27). Alla biologiska responsdata bör analyseras och rapporteras separat per kön. Om de antaganden som krävs för parametriska metoder inte uppfylls – onormal fördelning (t.ex. Shapiro-Wilks test) eller heterogen varians (Bartletts test eller Levenes test) – bör man överväga att homogenisera varianserna genom transformering av data före ANOVA utförs. Alternativt kan en viktad ANOVA övervägas. Dunnetts test (parametriserade) på en eller flera parvisa jämförelser eller Mann-Whitneys test med parametrisk justering (Bonferroni) kan användas för icke-monotona dos-responser. Andra statistiska tester kan användas (t.ex. Jonckheere-Terpstras test eller Williams test) om dos-responsen är approximativt monoton. Det statistiska flödesschemat i bilaga 8 kan vara till hjälp när man beslutar vilket statistiskt test som är det mest ändamålsenliga att använda. Ytterligare information kan också erhållas från OECD:s dokument *Current Approaches to Statistical Analysis of Ecotoxicity Data* (27).

Rapportering av testresultat

47. Studiedata bör inbegripa följande:

Testanläggning:

— ansvarig personal och deras studieansvar,

— varje laboratorium ska ha demonstrerat sina kunskaper i användningen av ett antal representativa kemikalier.

Testkemikalie:

— karakterisering av testkemikalien,

— fysikalisk form och relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper,

▼**M6**

— metod för beredning av testkoncentrationerna och hur ofta detta sker,

— information om stabilitet och biologisk nedbrytbarhet.

Lösningsmedel:

— karakterisering av lösningsmedlet (beskaffenhet, använd koncentration),

— motivering av valet av lösningsmedel (om annat än vatten).

Försöksdjur:

— art och stam,

— leverantör och specifik leverantörsanläggning,

— fiskens ålder vid testets början och dess reproduktiva status samt lekstatus,

— uppgifter om förfarandet för acklimatisering av djuren,

— fiskens kroppsvikt vid början av exponeringen (från ett delprov av fiskbeståndet).

Testbetingelser:

— testförfarande som har använts (typ av test, fisktäthet, antalstäthet, osv.),

— metod för beredning av stamlösningar och flödeshastighet,

— nominella testkoncentrationer, uppmätta koncentrationer av testlösningarna varje vecka och den använda analysmetoden, medelvärden av de uppmätta värdena och standardavvikelserna i testkärlen samt bevis för att mätningarna hänför sig till testkemikaliens koncentrationer i en äkta lösning,

— utspädningsvattnets egenskaper (t.ex. pH, hårdhet, alkalinitet, temperatur, halten löst syre, restklornivåer, halten organiskt kol, suspenderade fasta ämnen och eventuella andra gjorda mätningar),

— vattenkvaliteten i testkärlen: pH, hårdhet, temperatur och halten löst syre,

— detaljerade uppgifter om utfodringen (t.ex. typ av foder, källa, hur mycket fiskarna har fått och hur ofta samt, om möjligt, en analys av relevanta förorenande ämnen (t.ex. PCB, polycykliska aromatiska kolväten och bekämpningsmedel som innehåller organiska klorföreningar).

Resultat

— bevis för att kontrollerna uppfyller testets godkännandekriterier,

— uppgifter om mortalitet i alla koncentrationer och i kontrollen,

— de statistiska analystekniker som har använts, behandlingen av data och motivering av de tekniker som har använts,

— uppgifter om biologiska observationer av makromorfologi, inklusive sekundära könskaraktärer och vitellogenin,

▼M6

— resultaten av dataanalyserna, helst i tabellform och grafisk form,

— förekomsten av eventuella ovanliga reaktioner hos fiskarna och eventuella synliga effekter som har orsakats av testkemikalien.

RIKTLINJER FÖR TOLKNING OCH GODKÄNNANDE AV TESTRESULTATEN

48. Detta avsnitt innehåller några överväganden som måste göras vid tolkningen av testresultaten för de olika endpoints som uppmätts. Resultaten bör tolkas med försiktighet när testkemikalien förefaller orsaka uppenbar toxicitet eller inverka på försöksdjurens allmäntillstånd.

49. När man fastställer intervallet för testkoncentrationerna bör man vara noga med att inte överskrida den högsta tolererade koncentrationen för att möjliggöra en meningsfull tolkning av data. Det är viktigt att ha minst en behandling där det inte finns några tecken på toxiska effekter. Tecken på sjukdom och tecken på toxiska effekter bör utvärderas noggrant och rapporteras. Det är till exempel möjligt att produktionen av VTG hos honor även kan påverkas av den allmänna toxiciteten och av icke-endokrina toxiska verkningsmekanismer, t.ex. hepatotoxicitet. Tolkningen av effekterna kan dock stärkas av andra behandlingsnivåer på vilka effekterna inte kompliceras av systemisk toxicitet.

50. Det finns en del aspekter att beakta vid godkännandet av testresultaten. Som vägledning bör VTG-nivåerna i kontrollgrupperna med hanar och honor vara klart avgränsade och åtskilda med omkring tre storleksordningar för knölskallelöja och sebrafisk, och med ungefär en storleksordning för risfisk. Exempel på intervallerna för de värden som påträffats i kontroll- och behandlingsgrupperna finns i godkännanderapporterna (1, 2, 3, 4). Höga VTG-värden hos hanar i kontrollen skulle kunna äventyra testresponsen och testets förmåga att påvisa svaga östrogenagonister. Låga VTG-värden hos honor i kontrollen skulle kunna äventyra testresponsen och testets förmåga att påvisa aromatashämmare och östrogenantagonister. Valideringsstudierna användes för att utarbeta dessa riktlinjer.

51. Om ett laboratorium inte har utfört testet tidigare eller väsentliga förändringar (t.ex. byte av fiskstam eller leverantör) har gjorts är det lämpligt att en teknisk kompetensstudie utförs. Det rekommenderas att man använder kemikalier som omfattar en rad olika verkningsmekanismer eller som påverkar ett antal olika endpoints. I praktiken uppmuntras varje laboratorium att samla in egna historiska kontrolldata för hanar och honor och att utföra ett test med en positiv kontrollkemikalie för östrogenaktivitet (t.ex. 17-beta-östradiol vid 100 ng/l, eller en känd svag agonist) som leder till ökade VTG-nivåer i hanfiskar, en positiv kontrollkemikalie för aromatashämmande effekter (t.ex. fadrozol eller prokloraz vid 300 µg/l) som leder till minskade VTG-nivåer hos honfiskar, och en positiv kontrollkemikalie för androgen aktivitet (t.ex. 17-beta-trenbolon vid 5 µg/l), som leder till induktion av sekundära könskaraktärer hos honor av knölskallelöja och risfisk. Alla dessa data kan jämföras med tillgängliga data från valideringsstudierna (1, 2, 3) för att säkerställa laboratoriekompetensen.

52. I allmänhet bör mätningar av vitellogenin anses vara positiva om det finns en statistiskt signifikant ökning av VTG hos hanar ($p < 0,05$), eller en statistiskt signifikant minskning hos honor ($p < 0,05$) åtminstone vid den högsta testdosen jämfört med kontrollgruppen, och i avsaknad av tecken på allmän toxicitet. Ett positivt resultat bekräftas ytterligare om man kan påvisa ett biologiskt sannolikt samband mellan dosen och responskurvan. Som nämndes tidigare behöver inte minskningen av vitellogenin uteslutande bero på endokrina orsaker. I allmänhet bör ett positivt resultat dock tolkas som bevis för endokrin aktivitet in vivo, och normalt bör man då vidta åtgärder för ytterligare klargöranden.

▼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) Owens, J. W. (2007). Phase 3 report of the validation of the OECD Fish Screening Assay. CEFIC LRI Project, Endocrine. http://www.cefic-lri.org/index.php?page=projects (hämtad 18 september 2008).

(5) U.S. EPA (2007). Validation of the Fish Short-Term Reproduction Assay: Integrated Summary Report. Opublicerad rapport av den 15 december 2007. US Environmental Protection Agency, Washington, DC. 104 s.

(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 och Jobling (1995). Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. Environmental Health Perspective,103 Suppl 7,173–8 Redogörelse.

(8) Pawlowski, S., Sauer, A., Shears, J. A., Tyler, C. R. och Braunbeck, T. (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., Goto-Kazato, R., Trant, J. M., Nash, J. P., Korsgaard, B. och Bjerregaard, P. (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., Kahl, M. D., Jensen, K. M., Hornung, M. W., Korte, J. J., Makynen, E. A. och Leino, R. L. (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) Panter, G. H., Hutchinson, T. H., Hurd, K. S., Sherren, A., Stanley, R. D. och Tyler, C. R. (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., Cheek, A. O., Denslow, N. D., Heppell, S. A., McLachlan, J. A., LeBlanc, G. A. och Sullivan, C. V. (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) Panter, G. H., Tyler, C. R., Maddix, S., Campbell, P. M., Hutchinson, T. H., Länge, R., Lye, C. och Sumpter, J. P. (1999). Application of an ELISA to quantify vitellogenin concentrations in fathead minnows (Pimephales promelas) exposed to endocrine disrupting chemicals. CEFIC-EMSG research report reference AQ001. CEFIC, Bryssel, Belgien.

(14) Fenske M., van Aerle, R. B., Brack, S. C., Tyler, C. R. och Segner, H., (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., Andersen, L., Petersen, G. I., Korsgaard, B., Pedersen, K. L. och Bjerregaard, P. (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., Holbech, H., Lindholst, C., Noerum, U., Povlsen, A., Korsgaard, B. och Bjerregaard, P. (2002). Vitellogenin induction by 17ß-estradiol and 17ß-ethinylestradiol in male zebrafish (Danio rerio). Comp. Biochem. Physiol. C. 131, 531–539.

(17) Brion, F., Nilsen, B. M., Eidem, J. K., Goksoyr, A. och Porcher, J. M. 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., Morita, H., Nakano, N., Kang, I. J., Tadokoro, H., Oshima, Y., Honjo, T. och Kobayashi, K. (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., Koshio, M., Hori, H., Morita, M. och Iguchi, T. (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., Jensen, K. M., Makynen, E. A., Kahl, M. D., Korte, J. J., Homung, M. W., Henry, T. R., Denny, J. S., Leino, R. L., Wilson, V. S., Cardon, M. C., Hartig, P. C. och Gray, L. E. (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., Yokota, H., Matsubara, H., Maeda, M., Tadokoro, H. och Kobayashi, K. (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 Safety Publications. Series on Testing and Assessment. Nr 23. Paris

(23) Hutchinson, T. H., Shillabeer, N., Winter, M.J. och Pickford, D. B. (2006a). Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review. Redogörelse. Aquatic Toxicology 76, s. 69–92.

(24) Hutchinson, T. H., Ankley, G. T., Segner, H. och Tyler, C. R. (2006b). Screening and testing for endocrine disruption in fish-biomarkers as ”signposts,” not ”traffic lights,” in risk assessment. Environmental Health Perspectives 114 Suppl 1,106–14.

(25) Miles-Richardson, S. R., Kramer, V. J., Fitzgerald, S. D., Render, J. A., Yamini, B., Barbee, S. J. och Giesy, J. P. (1999). Effects of waterborne exposure to 17B-estradiol on secondary sex characteristics and gonads of the fathead minnow (Pimephales promelas). Aquat. Toxicol. 47, 129–145.

▼**M6**

(26) Martinovic, D., L. S. Blake, E. J. Durhan, K. J. Greene, M. D. Kahl, K. M., Jensen, E. A. Makynen, D. L. Villeneuve och 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 nr 54. ENV/JM/MONO(2006)18

(28) OECD (2012) OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupters (reviderad). Annex I to Draft Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Series on Testing and Assessment nr 150. ENV/JM/MONO(2012)22

▼M6

Tillägg 1

Förkortningar och definitioner

Kemikalie: ett ämne eller en blandning.

CV: variationskoefficient.

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay.

Fisktäthet: våtvikten fisk per vattenvolym.

Antalstäthet: antalet exemplar per vattenvolym.

VTG (vitellogenin): ett fosfolipoglykoprotein, en prekursor till ägguleprotein som normalt förekommer hos alla sexuellt aktiva honor av äggläggande arter.

HPG-axel: stressaxeln, bestående av hypotalamus, hypofysen och binjurebarken.

MTC: den högsta tolererade koncentrationen, dvs. ungefär 10 % av LC_{50}.

Testkemikalie: alla ämnen eller blandningar som testas med denna testmetod.

▼M6

Tillägg 2

Försöksbetingelser för endokrint screeningtest på fisk

1. Rekommenderade arter	**Knölskallelöja** (*Pimephales promelas*)	**Japansk risfisk** (*Oryzias latipes*)	**Sebrafisk** (*Danio rerio*)
2. Testtyp	Genomflödestest	Genomflödestest	Genomflödestest
3. Vattentemperatur	25 ± 2 °C	25 ± 2 °C	26 ± 2 °C
4. Belysningstyp	Fluorescerande lampor (brett spektrum)	Fluorescerande lampor (brett spektrum)	Fluorescerande lampor (brett spektrum)
5. Ljusintensitet	10–20 µE/m^2/s, 540–1 000 lux, eller 50–100 ft-c (omgivande ljusnivåer i laboratoriet)	10–20 µE/m^2/s, 540–1 000 lux, eller 50–100 ft-c (omgivande ljusnivåer i laboratoriet)	10–20 µE/m^2/s, 540–1 000 lux, eller 50–100 ft-c (omgivande ljusnivåer i laboratoriet)
6. Fotoperiod (övergångar mellan gryning och skymning är frivilliga, men anses dock inte vara nödvändiga)	16 timmar ljus, 8 timmar mörker	12–16 timmar ljus, 12–8 timmar mörker	12–16 timmar ljus, 12–8 timmar mörker
7. Fisktäthet	< 5 g/l	< 5 g/l	< 5 g/l
8. Testbehållarens storlek	Minst 10 l	Minst 2 l	Minst 5 l
9. Testlösningens volym	Minst 8 l	Minst 1,5 l	Minst 4 l
10. Volymutbyte av testlösningar	Minst 6 per dag	Minst 5 per dag	Minst 5 per dag
11. Testorganismernas ålder	Se punkt 20	Se punkt 20	Se punkt 20
12. Ungefärlig färskvikt för en vuxen fisk (g)	Honor: 1,5 ± 20 % Hanar: 2,5 ± 20 %	Honor: 0,35 ± 20 % Hanar: 0,35 ± 20 %	Honor: 0,65 ± 20 % Hanar: 0,4 ± 20 %
13. Antal fiskar per testkärl	6 (2 hanar och 4 honor)	10 (5 hanar och 5 honor)	10 (5 hanar och 5 honor)
14. Antal behandlingar	= 3 (plus lämpliga kontroller)	= 3 (plus lämpliga kontroller)	= 3 (plus lämpliga kontroller)
15. Antal kärl per behandling	Minst 4	Minst 2	Minst 2
16. Antal fiskar per testkoncentration	16 vuxna honor och 8 hanar (4 honor och 2 hanar i varje replikatkärl)	10 vuxna honor och 10 hanar (5 honor och 5 hanar i varje replikatkärl)	10 vuxna honor och 10 hanar (5 honor och 5 hanar i varje replikatkärl)
17. Utfodring	Levande eller frysta vuxna eller nauplier av *Artemia* två eller tre gånger dagligen (ad libitum), kommersiellt tillgängligt foder eller en blandning av dessa	*Artemia*-nauplier två eller tre gånger dagligen (ad libitum), kommersiellt tillgängligt foder eller en blandning av dessa	*Artemia*-nauplier två eller tre gånger dagligen (ad libitum), kommersiellt tillgängligt foder eller en blandning av dessa

▼M6

18. Luftning	Ingen såvida inte halten löst syre sjunker under 60 % luftmättnad	Ingen såvida inte halten löst syre sjunker under 60 % luftmättnad	Ingen såvida inte halten löst syre sjunker under 60 % luftmättnad
19. Utspädningsvatten	Rent yt- eller brunnsvatten, rekonstituerat vatten eller avklorerat kranvatten	Rent yt- eller brunnsvatten, rekonstituerat vatten eller avklorerat kranvatten	Rent yt- eller brunnsvatten, rekonstituerat vatten eller avklorerat kranvatten
20. Förexponeringsperiod	7 dagar rekommenderas	7 dagar rekommenderas	7 dagar rekommenderas
21. Den kemiska exponeringens varaktighet	21 dagar	21 dagar	21 dagar
22. Biologiska endpoints	överlevnad beteende sekundära könskaraktärer VTG	överlevnad beteende sekundära könskaraktärer VTG	överlevnad beteende VTG
23. Testets godkännandekriterier	Löst syre > 60 % av luftmättnadsvärdet, medeltemperatur 25 ± 2 °C, 90 % överlevnad i kontrollerna, uppmätta testkoncentrationer inom 20 % av medelvärdet för de uppmätta värdena per behandlingsnivå.	Löst syre > 60 % av luftmättnadsvärdet, medeltemperatur 24 ± 2 °C, 90 % överlevnad i kontrollerna, uppmätta testkoncentrationer inom 20 % av medelvärdet för de uppmätta värdena per behandlingsnivå.	Löst syre > 60 % av luftmättnadsvärdet, medeltemperatur 26 ± 2 °C, 90 % överlevnad i kontrollerna, uppmätta testkoncentrationer inom 20 % av medelvärdet för de uppmätta värdena per behandlingsnivå.

▼**M6**

Tillägg 3

Några kemiska egenskaper för godtagbart utspädningsvatten

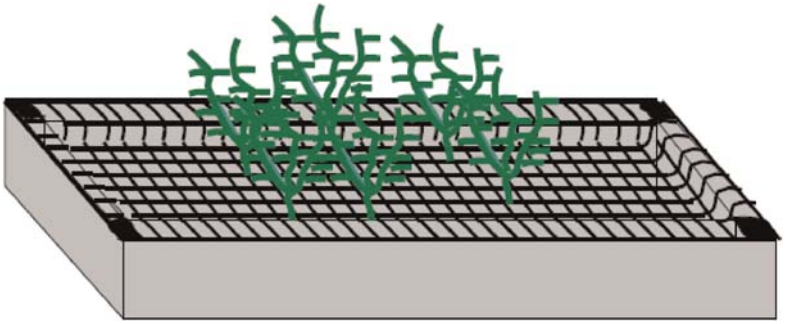
Komponent	Koncentrationer
Partiklar	< 20 mg/l
Halt av organiskt kol	< 2 mg/l
Ojoniserad ammoniak	< 1 µg/l
Resterande mängd klor	< 10 µg/l
Total mängd bekämpningsmedel som innehåller organiska fosforföreningar	< 50 ng/l
Total mängd bekämpningsmedel som innehåller organiska klorföreningar samt polyklorerade bifenyler	< 50 ng/l
Total mängd organiskt klor	< 25 ng/l

▼M6

Tillägg 4A

Leksubstrat för sebrafisk

Lekskål: en instrumentskål av glas, t.ex. 22 × 15 × 5,5 cm (längd × bredd × djup), täckt med ett avtagbart trådgaller av rostfritt stål (maskstorlek 2 mm). Gallret bör täcka instrumentskålens öppning på en nivå som ligger under kanten.



På gallret fästs ett leksubstrat. Det ger fiskarna en struktur som de kan simma in i. Konstgjorda akvarieväxter av grön plast är till exempel lämpliga (Obs! man bör beakta möjligheten att testkemikalien adsorberas till plastmaterialet). Plastmaterialet bör lakas ut i en tillräcklig volym med varmt vatten under tillräckligt lång tid för att säkerställa att inga kemikalier läcker ut i testvattnet. Vid användning av material av glas bör man se till att fiskarna varken skadas eller blir trängda under sina intensiva rörelser.

Avståndet mellan skålen och glasrutorna bör vara minst 3 cm för att säkerställa att fiskarna inte leker utanför skålen. Den rom som läggs i skålen faller ner genom gallret och kan samlas in 45–60 minuter efter att belysningen tänts. De genomskinliga äggen är inte vidhäftande och kan lätt räknas i transversellt ljus. Om man använder fem honor per kärl kan äggantal på under 20 per dag räknas som ett lågt, upp till 100 som ett genomsnittligt och mer än 100 som ett högt antal. Lekskålen bör tas bort, äggen samlas in och lekskålen återinföras i testkärlet antingen så sent som möjligt på kvällen eller mycket tidigt på morgonen. Tiden fram till återinförandet inte bör överstiga en timme. I annat fall kan leksubstratet som trigger framkalla individuell parning och lek på ovanliga tider. Om situationen kräver ett senare införande av lekskålen bör detta göras tidigast nio timmar efter att belysningen har tänts. Vid denna sena tidpunkt på dagen framkallas inte lekbeteendet längre.

▼**M6**

Tillägg 4B

Leksubstrat för knölskallelöja

Två eller tre kombinerade lekplattor och -skålar av keramik/plast/glas eller rostfritt stål placeras i varje testbehållare (t.ex. en 80 mm lång grå halvcirkelformad ränna i en 130 mm lång skål med uppvikt kant) (se bilden). Korrekt härdad PVC eller keramiska plattor har visat sig vara lämpliga som leksubstrat (Thorpe et al, 2007).

Det rekommenderas att plattorna är nötta för att förbättra vidhäftningen. Skålen bör också avskärmas för att förhindra fiskarna från komma åt de lagda äggen såvida inte äggens vidhäftningsförmåga har påvisats för det leksubstrat som används.



Basen är utformad för att samla upp alla ägg som inte fastnar på plattans yta och därför annars skulle falla till akvariets botten (eller de ägg som läggs direkt på den platta plastbasen). Alla leksubstrat bör lakas ur i utspädningsvatten under minst tolv timmar före användning.

HÄNVISNINGAR

Thorpe, K. L, Benstead, R., Hutchinson, T.H och Tyler C. R. (2007). An optimised experimental test procedure for measuring chemical effects on reproduction in the fathead minnow, *Pimephales promelas*. Aquatic Toxicology 81, 90–98.

▼M6

Tillägg 5A

Bedömning av sekundära könskaraktärer hos knölskallelöja för påvisande av vissa endokrint aktiva kemikalier

Översikt

Potentiellt viktiga kännetecken för det fysiska utseendet hos vuxna knölskallelöjor i tester av hormonstörande ämnen omfattar kroppsfärgen (dvs. ljus/mörk), färgmönster (dvs. förekomst eller avsaknad av vertikala strimmor), kroppsformen (dvs. formen på huvudet och det pektorala området, uttänjd buk), och särskilda sekundära könskaraktärer (dvs. parningstuberklernas antal och storlek, storleken på nackvalken och äggläggningsröret).

Parningstuberklerna återfinns på huvudet (nackvalken) på reproduktivt aktiva hanar av knölskallelöja, och sitter normalt i ett bilateralt symmetriskt mönster (Jensen m.fl., 2001). Kontrollhonor och unga hanar och honor utvecklar inte några tuberkler (Jensen m.fl., 2001). Det kan förekomma upp till åtta enskilda tuberkler runt ögonen och mellan hanarnas luktgropar. Det flesta och största tuberklerna är belägna i två parallella linjer omedelbart under luktgroparna och ovanför munnen. Många fiskar har grupper av tuberkler under underkäken. De som sitter närmast munnen förekommer i regel som ett enda par, medan de som är belägna mer ventralt kan bestå av upp till fyra tuberkler. Det faktiska antalet tuberkler är sällan mer än 30 (intervall 18–28; Jensen m.fl., 2001). De mest framträdande tuberklerna (mätt i antal) utgörs av en enda, relativt rund struktur med en höjd som ungefär motsvarar radien. De flesta reproduktivt aktiva hanar har också åtminstone några tuberkler som är förstorade och framträdande så att de inte kan särskiljas som enskilda strukturer.

Vissa typer av endokrinstörande kemikalier kan förorsaka abnorma förekomster av vissa sekundära könskaraktärer hos det motsatta könet. Agonister som påverkar androgenreceptorer, såsom 17-beta-metyltestosteron eller 17-beta-trenbolon, kan få honor av knölskallelöja att utveckla tydliga parningstuberkler (Smith 1974; Ankley m.fl., 2001, 2003), medan agonister som påverkar östrogenreceptorer kan minska parningstuberklernas antal eller storlek hos hanar (Miles-Richardson m.fl., 1999, Harries m.fl., 2000).

Nedan följer en redogörelse av karakteriseringen av parningstuberkler hos knölskallelöja på grundval av de förfaranden som används vid den amerikanska miljöskyddsmyndighetens (EPA) laboratorium i Duluth, Minnesota. Särskilda produkter och/eller utrustning kan ersättas med tillgängliga jämförbara material.

Fiskarna kan bäst observeras med hjälp av ett belyst förstoringsglas eller i ett belyst dissekeringsmikroskop med 3x förstoring. Observera fiskarna dorsalt och med den främre delen framåt (huvudet mot betraktaren).

a) Placera fisken i liten petriskål (t.ex. 100 mm i diameter), med främre delen framåt och buksidan nedåt. Fokusera sökaren för att göra det möjligt att identifiera tuberklerna. Rulla långsamt och försiktigt fisken från sida till sida för att identifiera tuberkelområdena. Räkna och klassificera tuberklerna.

b) Upprepa observationen på den ventrala huvudytan genom att placera fisken på ryggen med huvudet framåt i petriskålen.

c) Observationerna bör göras inom två minuter för varje fisk.

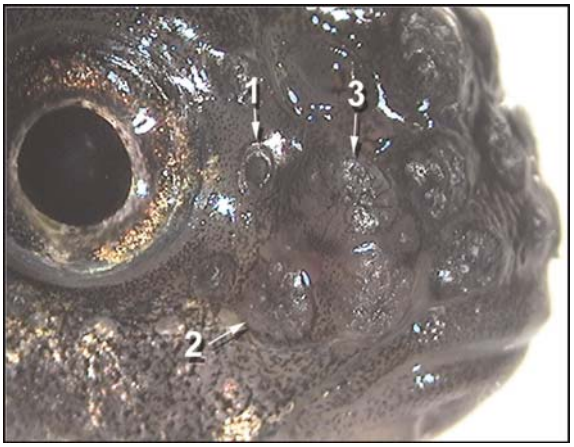
▼M6

Tuberkelräkning och klassificering

Sex särskilda områden har fastställts för bedömning av förekomsten och utvecklingen av tuberkler hos vuxna knölskallelöjor. En mall har utarbetats för att kartlägga var och i vilket antal tuberklerna förekommer (se slutet av detta tillägg). Antalet tuberkler registreras och deras storlek rangordnas kvantitativt enligt följande: 0–saknas, 1–förekommer, 2–förstorad och 3–framträdande för varje organism (figur 1).

Klassificera avsaknaden av tuberkler som 0. Klassificeringen 1–förekommer definieras som alla tuberkler som har en enda punkt vars höjd är nästan lika med dess radie (diameter). Klassificeringen 2–förstorad definieras som vävnad som liknar en asterisk, vanligtvis med en stor radial bas med räfflor eller fåror som utgår från medelpunkten. På höjden är tuberkeln ofta mer taggig men kan ibland vara något avrundad. Klassificeringen 3–framträdande refererar till vanligtvis ganska stora och rundade tuberkler med mindre definition i strukturen. Ibland växer dessa tuberkler ihop och utgör en enda massa längs ett enskilt område eller en kombination av områden (B, C och D enligt beskrivning nedan). Färgen och utformningen liknar dem för klassificering 2 men är ibland ganska godtyckliga. Med hjälp av detta klassificeringssystem får man i allmänhet ett totalt tuberkelpoängvärde på < 50 för en normal kontrollhane som har 18–20 tuberkler (Jensen m.fl., 2001).

Figur 1



Det faktiska antalet tuberkler hos vissa fiskar kan vara större än antalet mallrutor (tillägg A) för ett visst klassificeringsområde. Om detta är fallet kan ytterligare klassificeringsnummer läggas till inom, till höger eller till vänster om rutan. Mallen behöver därför inte vara symmetrisk. Ytterligare en metod för kartläggning av tuberklerna som sitter ihop två och två eller vertikalt längs munnens horisontalplan är att dubbelmarkera två tuberkelklassificeringspoäng i en enda ruta.

Kartläggningsregioner:

A – Tuberkler belägna runt ögat. Kartläggs från rygg till buk runt främre kanten på ögat. Vanligtvis i flertal hos fullt utvecklade kontrollhanar, saknas hos kontrollhonor, vanligtvis parvis (en nära varje öga) eller i ental hos honor som exponerats för androgener.

B – Tuberkler belägna mellan luktgroparna (sinneskanalporer). Vanligtvis parvis hos kontrollhanar vid mer förhöjda nivåer (2–förstorad eller 3–framträdande). Saknas hos kontrollhonor med viss förekomst och utveckling hos honor som exponerats för androgener.

C – Tuberkler belägna omedelbart framför luktgroparna, parallellt med munnen. I allmänhet förstorade eller framträdande hos fullt utvecklade kontrollhanar. Förekommer eller förstorade hos mindre utvecklade hanar eller androgenbehandlade honor.

▼M6

D – Tuberkler belägna parallellt med munlinjen. I allmänhet klassificeras dessa som ”utvecklade” hos kontrollhanar. Saknas hos kontrollhonor men förekommer hos androgenexponerade honor.

E – Tuberkler belägna på underkäken, nära munnen, vanligtvis små och vanligen i par. Varierar hos kontrollhanar och behandlade hanar samt behandlade honor.

F – Tuberkler belägna ventralt jämfört med E. Vanligen små och i par. Förekommer hos kontrollhanar och androgenexponerade honor.

HÄNVISNINGAR

(1) Ankley, G. T., Jensen, K. M., Kahl, M. D., Korte, J. J. och Makynen, M. E. (2001). Description and evaluation of a short-term reproduction test with the fathead minnow *(Pimephales promelas). Environ Toxicol Chem* 20, 1276–1290.

(2) Ankley, G. T., Jensen, K. M., Makynen, E. A., Kahl, M. D., Korte, J. J., Hornung, M. W., Henry, T. R., Denny, J. S., Leino, R. L., Wilson, V. S., Cardon, M. C., Hartig, P. C. och Gray, E. L. (2003). Effects of the androgenic growth promoter 17-β trenbolone on fecundity and reproductive endocrinology of the fathead minnow. Environ Toxicol Chem 22, 1350–1360.

(3) Harries, J. E., Runnalls, T., Hill, E., Harris, C. A.,Maddix, S., Sumpter, J. P. och Tyler, C. R. (2000). Development of a reproductive performance test for endocrine disrupting chemicals using pair-breeding fathead minnows (*Pimephales promelas*). Environ Sci Technol 34, 3003–3011.

(4) Jensen, K. M., Korte, J. J., Kahl, M. D., Pasha, M. S. och Ankley, G. T. (2001). Aspects of basic reproductive biology and endocrinology in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). Comp Biochem Physiol C 128, 127–141.

(5) Kahl, M. D., Jensen, K. M., Korte, J. J. och Ankley, G. T. (2001). Effects of handling on endocrinology and reproductive performance of the fathead minnow. J Fish Biol 59, 515–523.

(6) Miles-Richardson, S. R., Kramer, V. J., Fitzgerald, S. D., Render, J. A., Yamini, B., Barbee, S. J. och Giesy. J. P. (1999). Effects of waterborne exposure of 17-estradiol on secondary sex characteristics and gonads of fathead minnows (*Pimephales promelas*). Aquat Toxicol 47, 129–145.

(7) Smith, R. J. F. (1974). Effects of 17-methyltestosterone on the dorsal pad and tubercles of fathead minnows (*Pimephales promelas*). Can J Zool 52, 1031–1038.

Tuberkelmall	**Klassificering**
ID _____	1–förekommer
Datum _____	2–förstorad
Poäng totalt _____	3–framträdande

	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

Tillägg 5B

Bedömning av sekundära könskaraktärer hos risfisk för påvisande av vissa endokrint aktiva kemikalier

Nedan följer en redogörelse av mätningen av de papillära utväxter (*) som utgör de sekundära könskaraktärerna hos risfiskar (*Oryzias latipes*).

(*) Papillära utväxter förekommer normalt endast hos vuxna hanar och påträffas på den andra till den sjunde eller åttonde fenstrålen räknat från analfenans bakre kant (figur 1 och 2). Utväxterna förekommer sällan på den första fenstrålen från analfenans bakre kant. Detta standardförfarande omfattar mätning av utväxter på den första fenstrålen (fenstrålarna räknas i ordningsföljd från analfenans bakre kant i detta standardförfarande).

(1) Efter avlägsnandet av levern (tillägg 6) ska kroppen placeras i en konisk tub innehållande ca 10 ml 10 % neutral buffrad formalin (huvudet uppåt, stjärten nedåt). Om könskörteln fixeras i en annan lösning än 10 % neutral buffrad formalin lägger man ett transversellt snitt över kroppen mellan den främre delen av analfenan och anus med ett rakblad, samtidigt som man undviker att skada gonoporen och könskörteln i sig (figur 3). Placera den kraniala delen av fiskkroppen i fixeringslösningen för att bevara könskörteln, och stjärtdelen av fiskkroppen i 10 % neutral buffrad formalin enligt beskrivning ovan.

(2) Efter att fiskkroppen placerats i 10 % neutral buffrad formalin fattar man tag i analfenans främre del med en pincett och viker den i ca 30 sekunder så att analfenan hålls utspänd. När man lyfter upp analfenan med pincetten bör man försiktigt fatta tag i den främre delen så att man inte skadar de papillära utväxterna.

(3) Efter att analfenan hållits utspänd i ca 30 sekunder bevaras fiskkroppen i 10 % neutral buffrad formalin vid rumstemperatur fram till mätningen av de papillära utväxterna (mätningen ska utföras efter fixering i minst 24 timmar).

Mätning

(1) Fiskkroppen fixeras i 10 % neutral buffrad formalin i minst 24 timmar. Ta därefter upp fiskkroppen ur den koniska tuben och torka av formalinet på filterpapper (eller en pappersservett).

(2) Lägg fisken med buksidan upp. Klipp sedan försiktigt av analfenan med en liten dissektionssax (det är lämpligt att klippa av analfenan tillsammans med en liten bit vävnad från fenfästet (pterygiofor)).

(3) Fatta tag i den främre delen av den avskurna analfenan med en pincett och lägg den på ett objektglas med flera droppar vatten. Täck därefter analfenan med ett täckglas. Var noga med att inte skada de papillära utväxterna när analfenan hålls fast med pincetten.

(4) Räkna antalet ledplattor med papillära utväxter med hjälp av räknaren under ett biologiskt mikroskop (upprätt eller inverterat mikroskop). De papillära utväxterna kan kännas igen på en liten bildning av utväxter som är synbar

▼M6

på den bakre kanten av fenstrålen. Skriv in antalet ledplattor med papillära utväxter på varje fenstråle i tabellen (t.ex. första fenstrålen: 0, andra fenstrålen: 10, tredje fenstrålen: 12 osv.), och skriv in summan av dessa antal i Excel-tabellen per enskild fisk. Vid behov kan man fotografera analfenan och räkna antalet ledplattor med papillära utväxter på fotot.

(5) Efter mätningen läggs analfenan i den koniska tuben som beskrivs i (1) och bevaras.

Fig.1.

Diagram som visar könsskillnaden i analfenans storlek och form. A, hane, B, hona. Oka, T. B. (1931). On the processes on the fin rays of the male of *Oryzias latipes* and other sex characters of this fish. J. Fac. Sci., Tokyo Univ., IV:2, 209–218.

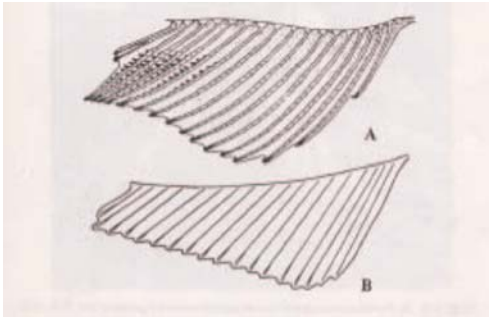
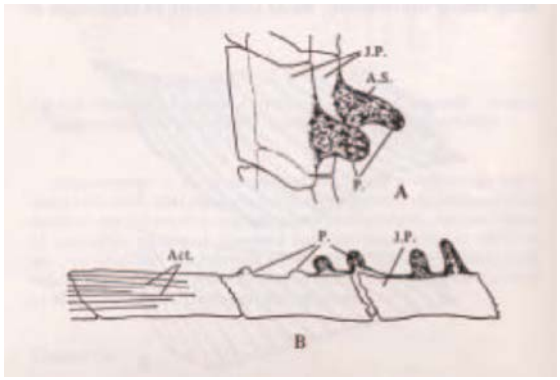


Fig.2.

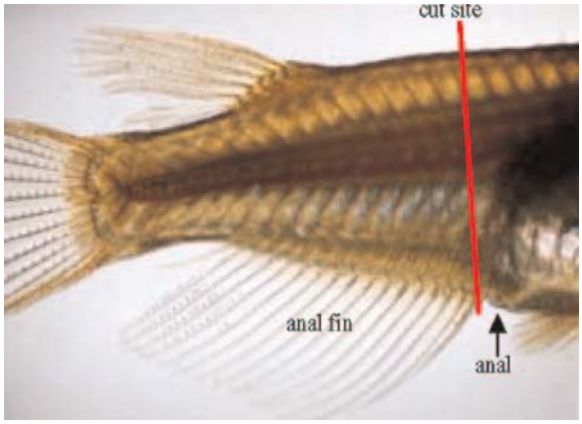
A, Utväxter på fenstrålarnas ledplattor i analfenan. J.P. = ledplatta, A.S. = axelavstånd, P. = utväxt. B, Fenstrålens distala ände. Aktinotrikierna (Act.) sitter på spetsen. Oka, T. B. (1931). On the processes on the fin rays of the male of *Oryzias latipes* and other sex characters of this fish. J. Fac. Sci., Tokyo Univ., IV:2, 209–218.



▼M6

Fig.3.

Fotografi av fiskkropp som visar var snittet ska läggas när könskörteln fixeras i en annan fixeringslösning än 10 % neutral buffrad formalin. I detta fall ska den övriga kroppen skäras av mellan analfenans främre kant och analöppningen med ett rakblad (röd linje), och fiskkroppens huvudsida läggs sedan i samma fixeringslösning som könskörteln och stjärtsidan läggs i 10 % neutral buffrad formalin.



▼M6

Tillägg 6

Rekommenderade förfaranden för provtagning för vitellogeninanalys

Man bör vara noga med att undvika korskontaminering mellan VTG-prover från hanar och honor.

Förfarande 1A: knölskallelöja, insamling av blod från stjärtvenen/-artären

Efter bedövning skärs stjärtspolen delvis av med en skalpell och blod insamlas från den kaudala venen/artären med ett hepariniserat mikrohematokrit-centrifugerat kapillärrör. Efter att blodet har samlats in isoleras plasman snabbt genom centrifugering vid 15 000 g i 3 minuter (eller vid 15 000 g i 10 minuter vid 4 °C). Om så önskas kan procentandelen hematokrit fastställas efter centrifugeringen. Plasmadelen avlägsnas sedan från mikrohematokritröret och lagras i ett centrifugrör med 0,13 enheter aprotinin (en proteashämmare) vid – 80 °C tills bestämningen av vitellogenin kan göras. Beroende på knölskallelöjans storlek (som är könsbestämd) uppgår mängden blod som kan samlas in till 5–60 µl per fisk (Jensen m.fl., 2001).

Förfarande 1B: Knölskallelöja, insamling av blod från hjärtat

Alternativt kan blod också samlas in genom hjärtpunktering med en hepariniserad spruta (1 000 enheter heparin per ml). Blodet överförs till eppendorfrör (på is) och centrifugeras sedan (5 minuter, 7 000 g, rumstemperatur). Plasman bör överföras till rena eppendorfrör (i alikvoter om volymen plasma är tillräckligt stor) och omedelbart frysas vid – 80 °C tills den kan analyseras (Panter m.fl., 1998).

Förfarande 2A: Japansk risfisk, utskärning av levern hos risfisk

Avlägsna testfisken från testbehållaren

(1) Testfisken bör avlägsnas ur testbehållaren med hjälp av en liten rund håv. Var noga med att inte tappa ner testfisken i de andra testbehållarna.

(2) I princip ska testfiskarna avlägsnas i följande ordning: kontroll, lösningsmedelskontroll (i förekommande fall), lägsta koncentrationen, mittersta koncentrationen, högsta koncentrationen och positiv kontroll. Dessutom bör alla hanar avlägsnas från en testbehållare innan de återstående honorna avlägsnas.

(3) Könet på varje testfisk fastställs på grundval av externa sekundära könskaraktärer (t.ex. formen på analfenan).

(4) Placera testfisken i en behållare för transport och för den till arbetsstationen där levern skärs ut. Kontrollera att etiketterna på testbehållaren och transportbehållaren stämmer och bekräfta att det antal fiskar som har avlägsnats från testbehållaren och den antal fiskar som återstår i behållaren stämmer överens med vad som förväntas.

(5) Om könet inte kan fastställas genom fiskens externa utseende avlägsnas alla fiskarna från testbehållaren. I detta fall bör könet identifieras genom granskning av könskörteln eller de sekundära könskaraktärerna under ett stereomikroskop.

▼**M6**

Utskärning av levern

(1) Överför testfisken från transportbehållaren till bedövningslösningen med den lilla runda håven.

(2) Efter bedövning av testfisken överförs den till ett filterpapper (eller en pappersservett) med hjälp av en anatomisk pincett. När man lyfter upp testfisken bör man fatta tag med pincetten på sidorna av huvudet för att undvika att stjärten bryts av.

(3) Torka av vattnet på ytan av testfisken på filterpappret (eller pappersservetten).

(4) Lägg fisken med buksidan upp. Lägg därefter ett mindre tvärgående snitt halvvägs mellan den ventrala halsregionen och den mellersta abdominala regionen med hjälp av en dissektionssax.

(5) För in dissektionssaxen i det lilla snittet och öppna buken från en punkt som är belägen kaudalt från gälmanteln till den kraniala sidan av anus längs bukens mittlinje. Var noga med att inte föra in dissektionssaxen för djupt så att levern och könskörteln skadas.

(6) Utför följande steg under ett stereomikroskop.

(7) Placera testfisken med buksidan upp på pappersservetten (en petriskål av glas eller ett objektglas går också bra).

(8) Vik ut bukhålans väggar med en precisionspincett och blottlägg de inre organen. Det är även godtagbart att blottlägga de inre organen genom att vid behov avlägsna den ena sidan av bukhålans vägg.

(9) Blotta den del som förbinder levern med gallblåsan med hjälp av en annan precisionspincett. Tag därefter fatt i gallgången och skär av gallblåsan. Var noga med att inte skada gallblåsan.

(10) Tag fatt i matstrupen och skär loss mag-tarmkanalen från levern på samma sätt. Var försiktig så att inte tarminnehållet läcker ut. Skär loss den kaudala mag-tarmkanalen från anus och avlägsna den från bukhålan.

(11) Skär bort fettmassan och andra vävnader från leverns utsida. Var noga med att inte skada levern.

(12) Tag fatt i portasystemet med hjälp av en precisionspincett och avlägsna levern från bukhålan.

(13) Placera levern på objektglaset. Avlägsna om så behövs allt övrigt fett och all främmande vävnad (t.ex. bukhinna) från leverns yta med hjälp av precisionspincetten.

(14) Väg levern med ett 1,5 ml mikrorör som emballagevikt med en elektronisk analysvåg. Registrera värdet i en tabell (läs: 0,1 mg). Bekräfta identifieringsinformationen på mikroröret som innehåller levern.

(15) Stäng mikrorörets lock. Förvara det i ett kylställ (eller ett isställ).

(16) När levern har avlägsnats diskas dissektionsinstrumenten eller ersätts med rena.

▼M6

(17) Avlägsna levrarna från alla fiskar i transportbehållaren enligt beskrivning ovan.

(18) När levrarna har skurits ut från alla fiskarna i transportbehållaren (dvs. alla hanar och honor i en testbehållare) placeras alla leverprover i ett provrörsställ med en etikett för identifiering och förvaras i en frys. När levrarna förs vidare till förbehandlingen strax efter utskärningen bärs proverna till nästa arbetsstation i ett kylställ (eller isställ).

Efter utskärningen av levern kan fiskkroppens sekundära könskaraktärer mätas.

Prov

Lagra leverproverna från testfiskarna vid ≤ – 70 °C om de inte ska användas i förbehandlingen kort efter utskärningen.

Fig-1

Ett snitt läggs precis framför bröstfenorna med en sax.

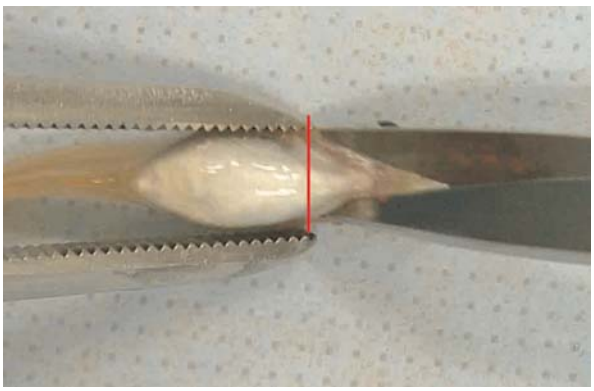
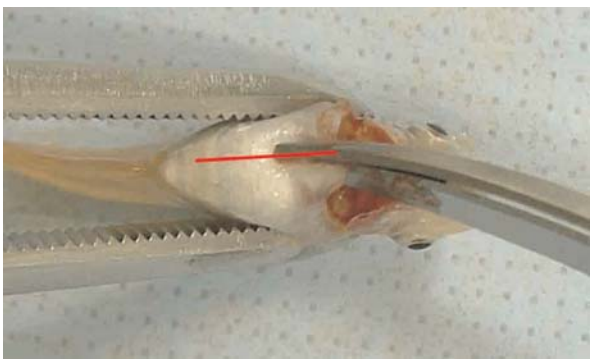


Fig-2

Buken öppnas längs mittlinjen med en sax till en punkt ungefär 2 mm kranialt från anus.



▼M6

Fig-3

Bukväggarna öppnas med en pincett för blottläggning av levern och andra interna organ. (Alternativt kan bukväggarna fästas lateralt).



Fig-4

Levern friläggs och avlägsnas utan att skära med hjälp av en peang.



Fig-5

Tarmarna dras försiktigt ut med hjälp av peangen.



▼M6

Fig-6

Båda ändarna av tarmarna och eventuellt vidhängande tarmkäx klipps av med en sax.



Fig-7 (hona)

Förfarandet är exakt detsamma för honor.



Fig-8

Det avslutade förfarandet.



Förfarande 2B: Japansk risfisk (*Oryzias latipes*), förbehandling av levern för analys av vitellogenin

Ta fram flaskan med homogenatbuffertlösning från ELISA-utrustningen och kyl den med krossad is (lösningens temperatur: ≤ 4 °C). Om man använder homogenatbuffertlösningen från EnBio:s ELISA-system ska lösningen tinas vid rumstemperatur. Kyl sedan ner flaskan med krossad is.

▼M6

Beräkna volymen av homogenatbuffertlösningen för levern på grundval av dess vikt (tillsätt 50 µl av homogenatbuffertlösningen per mg av levervikten för homogenatet). Om levern till exempel väger 4,5 mg är homogenatbuffertlösningens volym för levern 225 µl. Gör upp en förteckning över homogenatbuffertlösningens volym för alla levrarna.

Förberedelse av levern för förbehandling

(1) Ta ut det 1,5 ml mikrorör som innehåller levern ur frysen strax före förbehandlingen.

(2) Förbehandlingen av levrar från hanar bör genomföras före förbehandlingen av honornas levrar för att undvika kontaminering av vitellogenin. Förbehandlingen för testgrupperna bör dessutom utföras i följande ordning: kontroll, lösningsmedelskontroll (i förekommande fall), lägsta koncentrationen, mittersta koncentrationen, högsta koncentrationen och positiv kontroll.

(3) Antalet 1,5 ml mikrorör som innehåller leverprover som tagits ut ur frysen vid en viss tidpunkt bör inte överstiga det antal som kan centrifugeras vid den tidpunkten.

(4) Ordna 1,5 ml mikrorören som innehåller leverprover efter de nummer proven har i isstället (levern behöver inte tinas).

Utförandet av förbehandlingen

1. Tillsats av homogeniseringsbuffertlösningen

(1) Kontrollera på förteckningen vilken volym av homogenatbuffertlösningen som ska användas för ett visst leverprov och ställ in mikropipetten (volym: 100–1 000 µl) på den lämpliga volymen. Fäst en ren spets på mikropipetten.

(2) Pipettera upp homogenatbuffertlösningen från reagensflaskan och tillsätt 1,5 ml buffertlösning i det 1,5 ml mikrorör som innehåller levern.

(3) Tillsätt homogenatbuffertlösningen i alla 1,5 ml mikrorör som innehåller levrar enligt det förfarande som beskrivs ovan. Det finns ingen anledning att byta ut mikropipettspetsen med en ny. Om spetsen har blivit kontaminerad eller misstänks vara kontaminerad bör den dock bytas ut.

2. Homogenisering av levern

(1) Fäst en ny mortelstöt för homogenisering på mikrorörshomogenisatorn.

(2) För in mortelstöten i 1,5 ml mikroröret. Håll mikrorörshomogenisatorn och pressa levern mellan mortelstötens yta och innerväggen på 1,5 ml mikroröret.

(3) Kör mikrorörshomogenisatorn i 10–20 sekunder. Kyl ner 1,5 ml mikroröret med krossad is när detta görs.

(4) Ta ut mortelstöten från 1,5 ml mikroröret och låt det stå i ca 10 sekunder. Kontrollera därefter suspensionen visuellt.

(5) Om man kan se delar av lever i suspensionen ska steg (3) och (4) upprepas tills ett godtagbart leverhomogenat har beretts.

▼M6

(6) Kyl ner det suspenderade leverhomogenatet i isstället till dess att centrifugeringen utförs.

(7) Byt ut mortelstöten mot en ny för varje homogenat.

(8) Homogenisera alla levrar med homogenatbuffertlösningen enligt det förfarande som beskrivs ovan.

3. Centrifugering av det suspenderade leverhomogenatet

(1) Bekräfta att temperaturen i kylcentrifugkammaren är ≤ 5 °C.

(2) Ställ in 1,5 ml mikrorören som innehåller de suspenderade leverhomogenaten i kylcentrifugen (justera jämvikten vid behov).

(3) Centrifugera de suspenderade leverhomogenaten vid 13 000 g i 10 minuter vid ≤ 5 °C. Om supernatanterna är tillräckligt separerade kan dock centrifugalkraften och varaktigheten justeras efter behov.

(4) Efter centrifugeringen kontrolleras att supernatanterna är tillräckligt separerade (yta: fett, mellanparti: supernatant, bottenskikt: levervävnad). Om skikten inte är tillräckligt separerade centrifugeras suspensionen igen under samma betingelser.

(5) Avlägsna alla prov från kylcentrifugen och ordna dem efter de nummer proven har i isstället. Var noga med att inte återsuspendera de åtskilda skikten efter centrifugeringen.

4. Insamling av supernatanten

(1) Placera fyra 0,5 ml mikrorör i provrörsstället för lagring av supernatanten.

(2) Samla in 30 µl supernatant (separerad som det mellanliggande skiktet) med mikropipetten och tillsätt supernatanten till ett 0,5 ml mikrorör. Var noga med att inte få med fettet på ytan eller levervävnaden i det undre lagret.

(3) Samla in supernatanten och tillsätt den till två andra 0,5 ml mikrorör på samma sätt som beskrivs ovan.

(4) Samla in resten av supernatanten med mikropipetten (om möjligt: ≥ 100 µl). Tillsätt därefter supernatanten till de återstående 0,5 ml mikrorören. Var noga med att inte få med fettet på ytan eller levervävnaden i det undre lagret.

(5) Stäng locket på 0,5 ml mikroröret och anteckna supernatantens volym på etiketten. Kyl därefter omedelbart ner mikrorören i isstället.

(6) Byt ut spetsen på mikropipetten till en ny för varje supernatant. Om en stor mängd fett fäster sig vid spetsen bör den omedelbart bytas ut mot en ny för att undvika kontaminering av leverextraktet med fett.

(7) Fördela hela den centrifugerade supernatanten i 0,5 ml mikrorör enligt det förfarande som beskrivs ovan.

▼M6

(8) Efter att supernatanten har tillsatts till 0,5 ml mikrorör placeras de alla i provrörsstället med identifieringsetiketten och fryses sedan omedelbart ner i frysen. Om VTG-halterna ska mätas omedelbart efter förbehandlingen hålls ett 0,5 ml mikrorör (med 30 µl supernatant) kallt i provrörsstället och överförs sedan till arbetsstationen där ELISA-testet utförs. I ett sådant fall ska alla övriga mikrorör placeras i provrörsställen och frysas ner i frysen.

(9) Efter insamling av supernatanten kasseras restprodukterna på lämpligt sätt.

Lagring av provet

Lagra 0,5 ml mikrorören som innehåller supernatanten av leverhomogenatet vid ≤ – 70 °C tills de används för ELISA-testet.

Förfarande 3A: Sebrafisk, insamling av blod från den kaudala venen/artären

Omedelbart efter bedövning skärs stjärtspolen av transversalt, och blodet insamlas från den kaudala artären/venen med ett hepariniserat mikrohematokrit-centrifugerat kapillärrör. Volymerna blod varierar mellan 5 och 15 µl beroende på fiskens storlek. En lika stor mängd buffertlösning med aprotinin (6 µgml i fosfatbuffrad saltlösning (PBS)) tillsätts i mikrokapillärröret och plasman separeras från blodet genom centrifugering (5 minuter vid 600 g). Plasman samlas i provrören och lagras vid – 20 °C tills de analyseras med avseende på vitellogenin eller andra proteiner av intresse.

Förfarande 3B: Sebrafisk, insamling av blod genom hjärtpunktering

För att undvika koagulering av blod och nedbrytning av proteiner tas proven i en buffertlösning bestående av fosfatbuffrad saltlösning (PBS) som innehåller heparin (1 000 enheter/ml) och proteashämmaren aprotinin (2 TIU/ml). Som ingredienser i buffertlösningen rekommenderas heparin (ammoniumsalt) och frystorkad aprotinin. För blodprovstagning rekommenderas en spruta (1 ml) med en fast tunn nål (t.ex. Braun omnikan-F). Sprutan ska fyllas på förhand med en buffert (ca 100 µl) för att helt eluera de små blodvolymerna från varje fisk. Blodproven tas genom hjärtpunktering. Till att börja med bör fisken bedövas med MS-222 (100 mg/l). En lämplig bedövningsnivå gör det möjligt för användaren att urskilja sebrafiskens hjärtslag. Medan hjärtpunkteringen utförs ska sprutans kolv hållas under svagt tryck. Samla in blodvolymer på mellan 20 och 40 ml. Efter hjärtpunkteringen ska blod/buffert-blandningen tillsättas i provröret. Plasman separeras från blodet genom centrifugering (20 min., 5 000 g) och bör förvaras vid – 80 °C tills den behövs för analys.

Förfarande 3C: Standardförfarande: Sebrafisk, homogenisering av huvud och stjärt

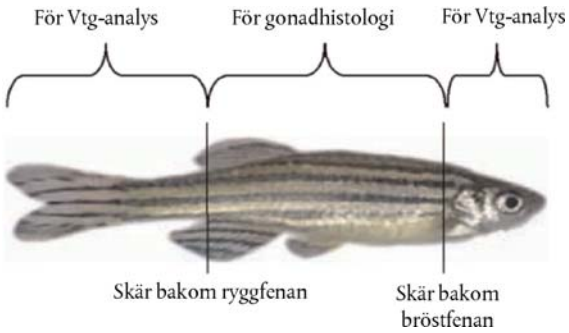
(1) Fiskarna bedövas eller avlivas i enlighet med testbeskrivningen.

(2) Huvudet och stjärten skärs av i enlighet med figur 1.

Obs! Alla dissektionsinstrument och skärbrädan bör sköljas och rengöras ordentligt (t.ex. med 96 % etanol) mellan hanteringen av varje enskild fisk att förhindra ”vitellogenin-förorening” från honor eller inducerade hanar till oinducerade hanar.

▼**M6**

Figur 1



(3) Den sammanlagda vikten av huvud och stjärt från varje fisk mäts till närmaste mg.

(4) Efter vägning placeras delarna i lämpliga rör (t.ex. 1,5 ml eppendorfrör) och fryses vid – 80 °C tills homogeniseringen, eller homogeniseras direkt på is med två mortelstötar av plast. (Andra metoder kan användas om de utförs på is och resultatet är en homogen massa). Obs! Rören ska numreras noggrant så att fiskarnas huvud och stjärt kan hänföras till deras respektive kroppar, som används för histologisk undersökning av könskörtlarna.

(5) När en homogen massa erhållits tillsätts iskall homogeniseringsbuffertlösning (*) med en mängd på 4 gånger vävnadens vikt. Fortsätt att arbeta med mortelstötarna tills blandningen är homogen. Viktig anmärkning: Nya mortelstötar används för varje fisk.

(6) Proven läggs på is tills centrifugeringen vid 4 °C och 50 000 × g i 30 minuter.

(7) Använd en pipett för att dosera ut portioner på 20 µl supernatant i minst två rör genom att doppa pipettens spets under fettlagret på ytan och försiktigt suga upp supernatanten utan att få med fragment av fett eller små bitar.

(8) Rören förvaras vid – 80 °C fram till användningen.

(*) **Buffertlösning för homogenisering:**

— 50 mM Tris-HCl pH 7,4; 1 % proteashämmarblandning (Sigma): 12 ml Tris-HCl pH 7,4 + 120 µl proteashämmarblandning.

— TRIS: TRIS-ULTRA PURE (ICN), t.ex. från Bie & Berntsen, Danmark.

— Proteashämmarblandning: Från Sigma (för däggdjursvävnader), produkt nr P 8340.

— *Anmärkning:* Buffertlösningen för homogenisering bör användas samma dag som den beretts. Lägg den på is under användningen.

▼M6

Tillägg 7

Vitellogeninberikade prover och referensstandard för tester

Varje dag som vitellogenintester utförs ska ett berikningsprov analyseras som beretts med en referensstandard för tester (inter-assay). Vitellogeninet som används för beredning av referensstandarden ska komma från ett annat parti än det som används för att bereda kalibreringsstandarderna för det test som utförs.

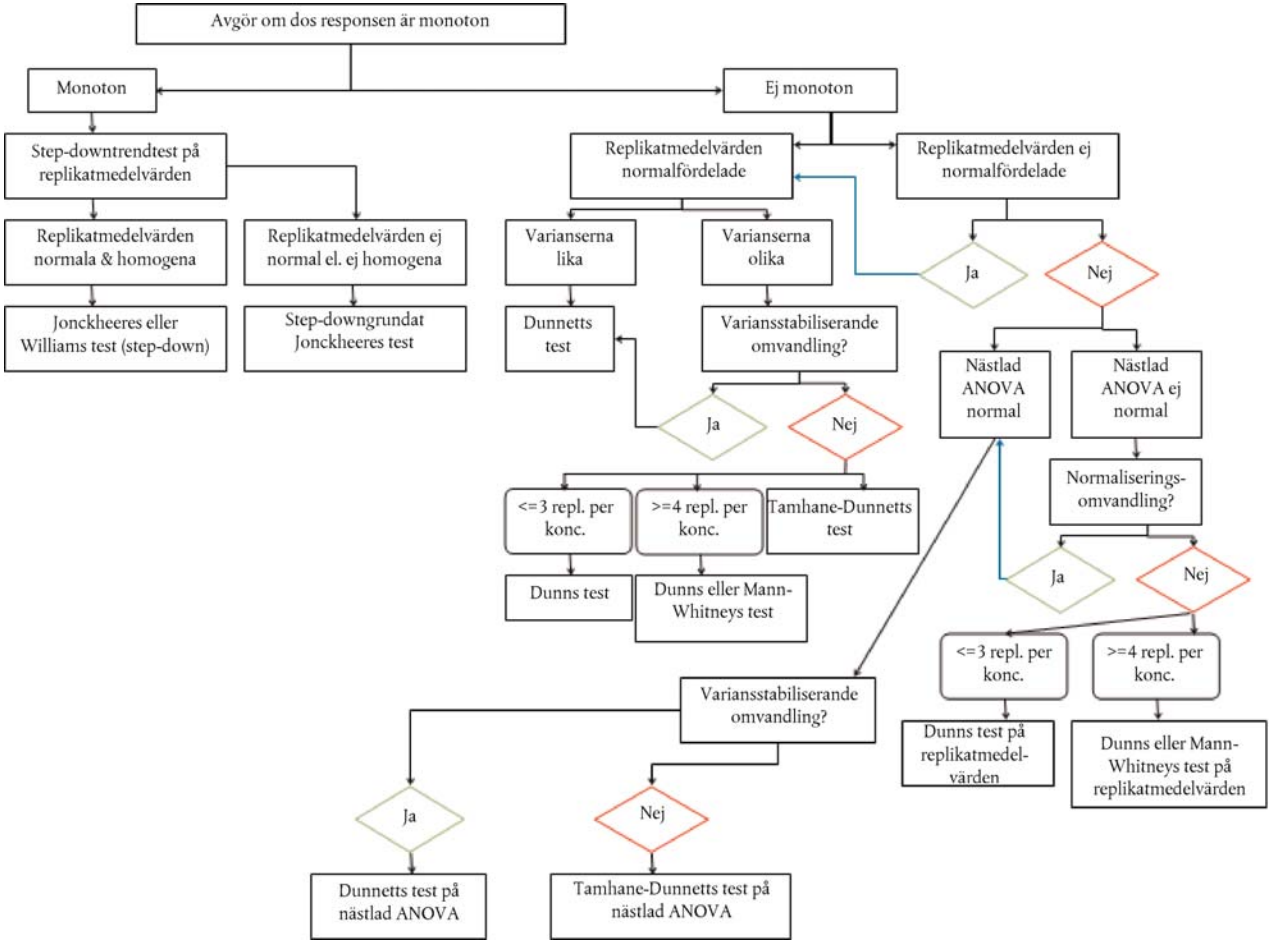
Ett berikningsprov bereds genom att man tillsätter en känd mängd av referensstandarden till ett prov med plasma från kontrollhanar. Provet berikas tills en vitellogeninkoncentration på mellan 10 och 100 gånger den förväntade vitellogeninkoncentrationen i hanliga kontrollfiskar uppnås. Det berikade provet med hanlig kontrollplasma kan komma från en enda fisk eller vara en blandning av flera olika fiskar.

Ett delprov av den oberikade hanliga kontrollplasman analyseras i minst två duplikatbrunnar. Det berikade provet analyseras också i minst två duplikatbrunnar. Den genomsnittliga mängden vitellogenin i de två icke-berikade hanliga kontrollproven läggs till den beräknade mängden vitellogenin som lagts till berikningsproverna i syfte att fastställa en förväntad koncentration. Förhållandet mellan denna förväntade koncentration och den uppmätta koncentrationen rapporteras tillsammans med resultaten från varje försöksomgång som utförs på samma dag.

▼M6

Tillägg 8

Flödesschema över beslutsgången för den statistiska analysen



▼M6

C.38 TEST PÅ GRODDJURSMETAMORFOS

INLEDNING

1. Denna testmetod motsvarar OECD:s testriktlinje (TG) 231 (2009). Behovet av att utveckla och validera ett testsystem som kan påvisa verksamma kemikalier i sköldkörtelsystemet hos ryggradsdjur härrör från farhågor att koncentrationen av kemikalier i miljön kan orsaka negativa effekter både hos människor och vilda djur. År 1998 inledde OECD en högprioriterad verksamhet för att se över befintliga testriktlinjer och utveckla nya testriktlinjer för screening och testning av potentiellt endokrinstörande ämnen. Ett inslag i verksamheten var att utveckla en testriktlinje för screening av verksamma kemikalier i sköldkörtelsystemet hos ryggradsdjur. Både en förbättrad version av studien i kapitel B.7 i denna bilaga, *28-dagars toxicitetsstudie med upprepad oral dosering på gnagare*, och testet på groddjursmetamorfos (Amphibian Metamorphosis Assay, AMA) föreslogs. Den förbättrade testmetoden B.7 har genomgått validering och en reviderad testmetod har presenterats. Testet på groddjursmetamorfos genomgick ett omfattande valideringsprogram som innefattade studier både inom och mellan laboratorier, vilka påvisade analysens relevans och tillförlitlighet (1) (2). Valideringen av analysen var därefter föremål för utvärdering av en oberoende expertpanel (3). Denna testmetod är resultatet av de erfarenheter som gjorts under valideringsundersökningarna för påvisande av sköldkörtelaktiva kemikalier, och under arbete som utförts annorstädes i OECD:s medlemsländer.

PRINCIP FÖR TESTMETODEN

2. Test på groddjursmetamorfos är ett screeningtest avsett att empiriskt identifiera kemikalier som kan störa den normala funktionen i hypotalamus-hypofys-tyroideaaxeln (nedan kallad HPT-axeln). Testet på groddjursmetamorfos representerar en allmän ryggradsdjursmodell såtillvida att det är baserat på HPT-axelns oförändrade strukturer och funktioner. Det är ett viktigt test eftersom groddjursmetamorfosen utgör en grundligt undersökt sköldkörtelberoende process som svarar på kemikalier som är verksamma inom HPT-axeln, och det är det enda befintliga test som påvisar sköldkörtelaktivitet hos ett djur som genomgår en morfologisk utveckling.

3. Den allmänna utformningen av testet innebär att grodyngel av arten *Xenopus laevis* (afrikansk klogroda) som befinner sig i stadium 51 utsätts för minst tre olika koncentrationer av testkemikalien och för en kontroll med utspädningsvatten under 21 dagar. Det finns fyra replikat för varje testkärl. Djurtätheten vid testets början är 20 grodyngel per testakvarium för alla behandlingsgrupper. Observerbara endpoints är bakbenslängd, längd från nos till kloak, utvecklingsstadium, våtvikt, sköldkörtelns histologi och dagliga observationer av dödligheten.

BESKRIVNING AV TESTMETODEN

Testarter

4. *Xenopus laevis* odlas i laboratorier världen över och kan lätt erhållas från kommersiella leverantörer. Reproduktionen kan lätt framkallas i denna art under hela året med hjälp av injektioner av humant koriongonadotropin (hCG), och stora antal av de yngel som utvecklas till följd av detta kan rutinmässigt uppfödas till utvalda utvecklingsstadier för att möjliggöra

▼M6

användningen av stadiumspecifika testprotokoll. Det är att föredra att yngelen som används i testet härrör från vuxna djur som odlats i eget laboratorium. Som ett alternativ, även om detta inte är att föredra, kan ägg eller embryon sändas till det laboratorium som genomför testet och genomgå acklimatisering. Att skicka yngelstadier för användning i testet är ett oacceptabelt förfarande.

Utrustning och materiel

5. Följande utrustning och materiel behövs för att utföra detta test:

a) exponeringssystem (se beskrivning nedan),

b) akvarier av glas eller rostfritt stål (se beskrivning nedan),

c) odlingsakvarier,

d) temperaturkontrollanordning (t.ex. värmare eller kylare (reglerbara till 22 ± 1 °C)),

e) termometer,

f) binokulärt dissektionsmikroskop,

g) digitalkamera med minst fyra megapixels upplösning och mikrofunktion,

h) bilddigitaliseringsprogram,

i) petriskål (t.ex. 100 × 15 mm) eller genomskinlig plastbehållare av jämförbar storlek,

j) analysvåg som kan mäta värden med tre decimalers noggrannhet (mg),

k) mätare för löst syre,

l) pH-mätare,

m) ljusintensitetsmätare som kan mäta i lux,

n) diverse laboratorieglas och verktyg,

o) justerbara pipetter (10–5 000 μl) eller diverse pipetter av motsvarande storlek,

p) testkemikalie i tillräckliga mängder för att utföra undersökningen, helst från ett enda parti,

q) lämpliga analysinstrument för testkemikalien eller upphandlade analystjänster.

Kemisk testbarhet

6. Testet på groddjursmetamorfos bygger på ett exponeringsprotokoll i vatten enligt vilket testkemikalien tillförs testbehållarna via ett genomflödessystem. Genomflödestestmetoder medför dock begränsningar av de typer av kemikalier som kan testas, grundat på kemikaliens fysikalisk-kemiska egenskaper. Innan detta protokoll används bör därför grundläggande uppgifter om kemikalien inhämtas som är relevanta för att fastställa testbarheten, och OECD:s vägledningsdokument *Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures* (4) bör konsulteras.

▼M6

Egenskaper som pekar på att kemikalien kan vara svår att testa i akvatiska system inbegriper höga fördelningskoefficienter oktanol/vatten (log K_{ow}), hög flyktighet, känslighet för hydrolys och känslighet för fotolys under omgivande laboratorieljusförhållanden. Även andra faktorer kan vara relevanta för att fastställa testbarheten och bör fastställas från fall till fall. Om det är omöjligt att genomföra ett framgångsrikt test med testkemikalien med hjälp av ett genomflödessystem kan ett statiskt förnyelsesystem användas. Om ingetdera system lämpar sig för testkemikalien är standardförfarandet att inte testa den med detta protokoll.

Exponeringssystem

7. Ett utspädningssystem med genomströmning är att föredra, när så är möjligt, framför ett statiskt förnyelsesystem. Om någon av testkemikaliernas fysikaliska och/eller kemiska egenskaper inte lämpar sig för ett utspädningssystem med genomströmning kan ett alternativt exponeringssystem (t.ex. statisk förnyelse) användas. Systemet bör ha komponenter av glas, rostfritt stål och/eller polytetrafluoreten, som klarar kontakt med vatten. Lämpliga plaster kan dock användas om de inte äventyrar undersökningen. Exponeringsakvarierna ska vara av glas eller rostfritt stål och vara utrustade med ståndrör som klarar en ungefärlig tankvolym på mellan 4,0 och 10,0 liter och ett minsta vattendjup på 10–15 cm. Systemet bör kunna underhålla alla exponeringskoncentrationer och en kontroll, med fyra replikat per testkärl. Flödeshastigheten till varje akvarium ska vara konstant, både med tanke på bibehållandet av de biologiska betingelserna och den kemiska exponeringen (t.ex. 25 ml/min). Behandlingsakvarierna bör slumpmässigt ges en plats i exponeringssystemet för att minska eventuella positionsberoende effekter, inbegripet små variationer i temperatur, ljusintensitet osv. Lysrör bör användas för att ge en fotoperiod på 12 timmar ljus/12 timmar mörker vid en intensitet som varierar från 600–2 000 lux (lumen/m^2) vid vattenytan. Vattentemperaturen bör hållas vid 22 ± 1 °C, pH-värdet mellan 6,5–8,5, och halten löst syre > 3,5 mg/l (> 40 % av luftens mättnad) i varje testakvarium. Vattentemperaturen, pH-värdet och halten löst syre bör mätas minst en gång i veckan. Temperaturen bör helst mätas kontinuerligt i minst ett testkärl. I tillägg 1 beskrivs de försöksbetingelser under vilka protokollet bör utföras. För ytterligare information om inrättandet av exponeringssystem med genomströmning och/eller statiska förnyelsesystem, se ASTM:s *Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians* (5) och allmänna akvatiska toxikologiska tester.

Vattenkvalitet

8. Allt vatten som är tillgängligt lokalt (t.ex. källvatten eller kolfiltrerat kranvatten) och tillåter normal tillväxt och utveckling av grodyngel av *X. laevis* kan användas. Eftersom den lokala vattenkvaliteten kan variera avsevärt från ett område till ett annat bör vattenkvaliteten analyseras, särskilt om historiska uppgifter om vattnets användbarhet för odling av *Xenopus* inte finns att tillgå. Man bör vara särskilt noga med att se till att vattnet är fritt från koppar, klor och kloraminer, som alla är giftiga för grodor och grodyngel. Det rekommenderas vidare att man analyserar vattnets bakgrundsnivåer av fluorid, perklorat och klorat (biprodukter från rening av dricksvatten), eftersom alla dessa anjoner är substrat av sköldkörtelns jodtransportör och ökade halter av var och en av dessa anjoner kan påverka

▼M6

undersökningens resultat. Analysen bör utföras innan testet inleds och testvattnet bör normalt bör vara fritt från dessa anjoner.

Jodidkoncentrationen i testvattnet

9. För att sköldkörteln ska kunna bilda sköldkörtelhormoner måste tillräckligt med jodid vara tillgängligt för ynglen via en kombination av vatten- och födokällor. För närvarande finns det inga empiriskt härledda riktlinjer för minsta möjliga koncentrationer av jodid. Tillgången på jodid kan dock påverka sköldkörtelsystemets mottaglighet för sköldkörtelaktiva ämnen, och man vet att ämnet justerar sköldkörtelns grundläggande aktivitet, en aspekt som bör uppmärksammas vid tolkningen av resultaten från sköldkörtelns histopatologi. Uppmätta koncentrationer av vattenbaserat jodid i testvattnet ska därför rapporteras. Man har kunnat påvisa, grundat på tillgängliga uppgifter från valideringsstudierna, att protokollet fungerar bra när koncentrationerna av jodid (I^-) i testvattnet ligger på mellan 0,5 och 10 μg/l. Helst ska jodidkoncentrationen i testvattnet vara minst 0,5 μg/l. Om testvattnet har rekonstituerats från avjonat vatten bör jod tillsättas med en koncentration på minst 0,5 μg/l. Alla ytterligare tillsatser av jod eller andra salter till testvattnet bör noteras i rapporten.

Djurhållning

Skötsel och avel av vuxna djur

10. Skötsel och avel av vuxna djur bedrivs enligt standardiserade riktlinjer, och läsaren hänvisas till standardvägledningen för utförande av test avseende fosterskador hos grodor (FETAX) (6) för mer utförlig information. Sådana standardiserade riktlinjer ger exempel på lämplig skötsel och lämpliga avelsmetoder, men behöver inte strikt följas. För att framkalla parning injiceras 3–5 par vuxna honor och hanar med humant koriongonadotropin (hCG). Hon- och hanexemplar injiceras med ca 800 IU–1 000 respektive 600 IU–800 IU hCG upplöst i en 0,6–0,9-procentig saltlösning. Avelspar hålls i stora akvarier, ostört och under statiska förhållanden i syfte att uppmuntra till amplexus. Varje avelsakvarium bör ha en falsk botten av rostfritt stål eller plastnät som gör att äggen sjunker till akvariets botten. Grodor som injiceras sent på eftermiddagen kommer vanligtvis att lägga sina ägg mitt på förmiddagen dagen därpå. Efter att en tillräcklig mängd ägg har lagts och befruktats bör de vuxna djuren avlägsnas från avelsakvarierna.

Skötsel och urval av yngel

11. Efter att de vuxna djuren avlägsnats från avelsakvarierna samlas äggen in och deras livsduglighet utvärderas med hjälp av en representativ delmängd av embryon från alla avelsakvarierna. De bästa enskilda romkornen (2–3 rekommenderas för att utvärdera kvaliteten på rommen) bör behållas grundat på embryots livskraft och förekomsten av ett tillräckligt antal (minst 1 500) embryon. Alla organismer som används i en undersökning ska komma från en enstaka äggläggningshändelse (dvs. rommen ska inte blandas med rom från andra individer). Embryona överförs till en stor flat bunke eller skål och alla synliga döda eller onormala ägg (se definitionen i (5)) avlägsnas med hjälp av en pipett eller ett droppglas. De friska embryona från var och en av de tre äggläggningshändelserna överförs till tre separata kläckningsakvarier. Fyra dagar efter att de har placerats i kläckningsakvarierna väljs de bästa ynglen ut, byggt på livskraft och

▼M6

kläckningsframgång, och ynglen överförs till ett lämpligt antal uppfödningsakvarier med en temperatur på 22 ± 1 °C. Dessutom överförs ett ytterligare antal yngel till extraakvarier för att ha i reserv om yngel dör i uppfödningsakvarierna under den första veckan. Detta förfarande bibehåller en konsekvent organismtäthet och minskar därmed de utvecklingsmässiga skillnaderna inom kohorten från samma äggläggningshändelse. Alla uppfödningsakvarier bör dagligen sugas rena. Som en försiktighetsåtgärd bör vinyl- eller nitrilhandskar användas i stället för latexhandskar. Döda djur bör avlägsnas dagligen och ersättningsyngel bör tillsättas för att upprätthålla organismtätheten under den första veckan. Utfodring bör ske minst två gånger per dag.

12. Under förexponeringsfasen acklimatiseras grodynglen till betingelserna i den faktiska exponeringsfasen, inklusive fodertyp, temperatur, ljus/mörker-cykel och odlingsmediet. Det rekommenderas därför att samma odlings-/utspädningsvatten används både under förexponeringsfasen och under exponeringen. Om ett statiskt odlingssystem används för att hålla grodynglen under förexponeringsfasen bör odlingsmediet ersättas helt minst två gånger per vecka. Trängsel på grund av hög yngeltäthet under förexponeringsperioden bör undvikas, eftersom sådana effekter avsevärt skulle kunna påverka grodynglens utveckling under den påföljande testfasen. Djurtätheten under uppfödningen bör därför inte överstiga ca fyra grodyngel/l odlingsmedium (för statiska exponeringssystem) eller tio grodyngel/l odlingsmedium (med t.ex. 50 ml/min flödeshastighet i förexponerings- eller odlingssystemet). Under dessa förhållanden bör grodynglen utvecklas från stadium 45/46 till stadium 51 inom tolv dagar. Representativa grodyngel från detta bestånd bör inspekteras dagligen under utvecklingsstadiet i syfte att uppskatta den lämpliga tidpunkten för exponeringens inledning. Man bör vara noga med att inte utsätta grodynglen för stress och trauman, särskilt under förflyttning, rengöring av akvarierna och hanteringen av yngel. Stressande förhållanden/händelser bör undvikas, såsom högt och/eller ständigt buller, knackningar på akvarierna, vibrationer i akvarierna, alltför stor aktivitet i laboratoriet och snabba förändringar av miljöfaktorerna (ljus, temperatur, pH-värde, halten av löst syre, vattenflödeshastighet osv.). Om grodynglen inte utvecklas till stadium 51 inom 17 dagar efter befruktningen bör en alltför hög stressnivå betraktas som en möjlig orsak.

Odling och utfodring av yngel

13. Grodynglen utfodras t.ex. med kommersiellt tillgängligt grodyngelfoder som används i valideringsstudier (se även tillägg 1) under hela förexponeringsperioden (efter stadium 45/46 enligt Nieuwkoop och Faber (NF) (8)) och under hela testperioden på 21 dagar, eller annat foder som har visat sig göra det möjligt att utföra testet på groddjursmetamorfos på ett likvärdigt sätt. Utfodringsprogrammet under förexponeringsperioden bör vara väl anpassat för att uppfylla de växande grodynglens behov. Detta innebär att små fodergivor bör ges till de nykläckta grodynglen flera gånger per dag (minst två gånger). Överbliven mat bör undvikas för att i) bevara vattenkvaliteten och ii) förhindra att grodynglens gälar täpps igen

▼M6

av foderpartiklar och slam. För det grodyngelfoder som används i valideringsstudierna bör den dagliga fodergivan ökas allteftersom grodynglen växer till ca 30 mg/djur/dag strax innan testet inleds. Detta kommersiellt tillgängliga foder har i valideringsstudierna visat sig stödja god tillväxt och utveckling hos yngel av *X. laevis* och utgörs av fina partiklar som förblir suspenderat i vattnet under en lång tid och kan sköljas bort med flödet. Den dagliga mängden foder bör därför delas upp i mindre givor och ges minst två gånger per dag. En översikt av utfodringsprogrammet för detta foder visas i tabell 1. Utfodringstakten bör registreras. Fodret kan ges torrt eller som en stamlösning som bereds i utspädningsvatten. Färsk stamlösning bör beredas varannan dag och lagras vid 4 °C när den inte används.

Tabell 1.

Utfodringsprogram med kommersiellt tillgängligt grodyngelfoder som används i valideringsstudier för yngel av *X. laevis* under livsdelen av testet på groddjursmetamorfos under genomflödesförhållanden

Undersökningsdag	Fodergiva (mg foder/djur/dag)
0–4	30
5–7	40
8–10	50
11–14	70
15–21	80

Analytisk kemi

14. Innan man utför en studie bör testkemikaliens stabilitet utvärderas med hjälp av befintlig information om dess löslighet, nedbrytbarhet och flyktighet. Prover ska tas på testlösningarna från varje replikatakvarium vid varje koncentration för kemiska analyser vid testets inledning (dag 0), och varje vecka under testets gång med minst fyra prover. Det rekommenderas också att varje testkoncentration analyseras i samband med systemförberedelser innan testet inleds för att kontrollera systemets prestanda. Dessutom rekommenderas att stamlösningarna analyseras när de byts, särskilt om stamlösningens volym inte tillhandahåller tillräckliga mängder av kemikalien för att räcka över hela rutinprovtagningsperioden. När det gäller kemikalier som inte kan detekteras vid några av eller alla de koncentrationer som används i ett test bör stamlösningarna mätas och flödeshastigheten i systemet registreras för att beräkna de nominella koncentrationerna.

Tillsats av kemikalier

15. Den metod som används för tillsats av testkemikalien i systemet kan variera beroende på kemikaliens fysikalisk-kemiska egenskaper. Vattenlösliga kemikalier kan upplösas i alikvoter av testvatten vid koncentrationer som möjliggör tillsats vid den avsedda testkoncentrationen i ett genomflödessystem. Kemikalier som är flytande vid rumstemperatur och svårlösliga i vatten kan tillsättas med hjälp av vätska/vätska-mättningsmetoder. Kemikalier som är fasta vid rumstemperatur och svårlösliga i vatten kan tillsättas med hjälp av kolonnmättnadskärl med glasull (7). Helst ska man

▼M6

använda ett bärämnesfritt testsystem, men olika testkemikalier har olika fysikalisk-kemiska egenskaper som sannolikt kräver olika strategier för beredning av exponeringsvattnet med kemikalien. Lösningsmedel eller bärämnen för om möjligt undvikas av följande skäl: i) vissa lösningsmedel kan i sig leda till toxicitet och/eller oönskade eller oväntade endokrinologiska responser, ii) testning av kemikalier över deras vattenlöslighetsnivå (som ofta är fallet vid användning av lösningsmedel) kan leda till felaktiga bestämningar av de effektiva koncentrationerna, och iii) användning av lösningsmedel i mer långsiktiga tester kan leda till bildning av en betydande mängd ”biofilm” (dvs. hinnor bestående av mikroorganismer) på grund av den mikrobiella aktiviteten. För kemikalier som är svåra att testa kan lösningsmedel användas som en sista utväg, och OECD:s vägledningsdokument om akvatisk toxicitetstestning av svåra ämnen och blandningar bör konsulteras (4) för att fastställa vilken metod som är bäst lämpad. Valet av lösningsmedel avgörs av testkemikaliens kemiska egenskaper. Lösningsmedel som har visat sig vara lämpliga för akvatisk toxicitetstestning inbegriper aceton, etanol, metanol, dimetylformamid och trietylenglykol. Om ett lösningsmedel används som bärämne bör lösningsmedlets koncentrationer ligga under den kroniska nolleffektkoncentrationen (NOEC). I OECD:s vägledningsdokument rekommenderas en koncentration på högst 100 µl/l, och i en nyligen utgiven redogörelse rekommenderas att lösningsmedelskoncentrationerna ska vara så låga som 20 µl/l utspädningsvatten (12). Om lösningsmedel används som bärämnen bör lämpliga kontroller med lösningsmedel utvärderas utöver kontrollerna utan lösningsmedel (rent vatten). Om det inte är möjligt att tillsätta en kemikalie via vattnet, antingen på grund av dess fysikalisk-kemiska egenskaper (låg löslighet) eller kemikaliens begränsade tillgång, kan man överväga att tillsätta den via födan. Begynnande forskning har gjorts på exponering via födan, men denna exponeringsväg används dock vanligen inte. Valet av metod ska dokumenteras och verifieras analytiskt.

Val av testkoncentrationer

Fastställande av den högsta testkoncentrationen

16. I detta test ska den högsta testkoncentrationen bestämmas av testkemikaliens löslighetsgräns, den högsta tolererade koncentrationen (nedan kallad MTC-koncentrationen) för starkt toxiska kemikalier, eller 100 mg/l, beroende på vilken som är lägst.

17. MTC-koncentrationen definieras som den högsta testkoncentration av kemikalien som leder till mindre än 10 % akut dödlighet. Om man använder denna metod förutsätter man att det finns befintliga empiriska data om den akuta dödligheten på grundval av vilka MTC-koncentrationen kan uppskattas. Uppskattningar av MTC-koncentrationen kan vara otillförlitliga och kräver vanligen ett visst mått av fackmässigt omdöme. Även om användningen av regressionsmodeller kan vara den mest tekniskt välgrundade metoden för uppskattning av MTC-koncentrationen, kan ett användbart närmevärde för MTC-koncentrationen härledas ur befintliga akuta toxicitetsuppgifter genom att använda 1/3 av det akuta LC_{50}-värdet. Uppgifter om akut toxicitet kan dock saknas för den art som testas. Om artspecifika uppgifter om akut toxicitet inte finns att tillgå, kan ett 96-timmars LC_{50}-test genomföras med grodyngel som är representativa för (dvs. i samma utvecklingsstadium som) ynglen som testas i testet på groddjursmetamorfos. Om data från andra vattenlevande arter finns tillgängliga (t.ex. LC_{50}-studier av fiskar eller andra groddjursarter) kan som ett alternativ en professionell bedömning göras för att uppskatta en sannolik MTC-koncentration baserat på extrapolering mellan arter.

18. Om kemikalien inte är akut toxisk och dessutom är löslig vid koncentrationer över 100 mg/l kan, som ett ytterligare alternativ, 100 mg/l betraktas som den högsta testkoncentrationen (HTC), eftersom denna koncentration vanligtvis betraktas som ”praktiskt taget icke-toxisk”.

▼M6

19. Även om de inte utgör det rekommenderade förfarandet kan metoder med statisk förnyelse användas om genomflödestestmetoder visar sig vara otillräckliga för att uppnå MTC-koncentrationen. Om statisk förnyelse används ska stabiliteten hos testkemikaliens koncentration dokumenteras och förbli inom gränsvärdena för utförandekriterierna. Förnyelseperioder på 24 timmar rekommenderas. Förnyelseperioder som överskrider 72 timmar kan inte godtas. Dessutom bör parametrar för vattenkvalitet (t.ex. halten löst syre, temperatur, pH osv.) mätas vid utgången av varje förnyelseperiod, omedelbart före förnyelsen.

Testkoncentrationsintervall

20. Minst tre testkoncentrationer och en kontroll med rent vatten (och vid behov en vehikelkontroll) ska användas. Minsta möjliga skillnad mellan den högsta och lägsta testkoncentrationen ska vara ungefär en storleksordning. Högsta separationsfaktor mellan doserna är 0,1 och minsta 0,33.

FÖRFARANDE

Testets inledning och genomförande

Dag 0

21. Exponeringen bör inledas när ett tillräckligt antal grodyngel i förexponeringspopulationen har nått utvecklingsstadium 51 enligt Nieuwkoop och Faber (8), vilket är mindre än eller lika med 17 dagars ålder efter befruktningen. Vid val av försöksdjur ska friska grodyngel med normalt utseende från stampopulationen samlas i ett enda kärl som innehåller en lämplig volym utspädningsvatten. Vid bestämning av utvecklingsstadiet ska grodynglen avlägsnas ett och ett från samlingsakvariet med hjälp av ett litet nät eller en liten sil och överföras till ett genomskinligt mätkärl (t.ex. en 100 mm petriskål) med utspädningsvatten. När man fastställer utvecklingsstadiet ska man helst inte använda bedövning, men man kan bedöva grodynglen ett och ett före hanteringen med hjälp av 100 mg/l trikainmetansulfonat (t.ex. MS-222), tillräckligt buffrat med natriumbikarbonat (pH 7,0). Om man använder bedövning ska metoder för lämplig användning av t.ex. MS-222 för bedövning erhållas från laboratorier med erfarenhet av detta och rapporteras tillsammans med testresultaten. Djuren bör hanteras varsamt under denna överföring i syfte att minimera hanteringsstress och för att undvika skada.

22. Djurens utvecklingsstadium fastställs med hjälp av ett binokulärt dissektionsmikroskop. För att minska de grundläggande variationerna i utvecklingsstadier är det viktigt att fastställandet av stadierna genomförs så noggrant som möjligt. Enligt Nieuwkoop och Faber (8) är det främsta utvecklingsmässiga kännetecknet för urval av organismer i stadium 51 bakbenens morfologi. Bakbenens morfologiska egenskaper bör granskas under mikroskop. Även om Nieuwkoop och Fabers (8) kompletta riktlinjer bör konsulteras för heltäckande information om hur grodynglens utvecklingsstadier kan fastställas kan man tillförlitligt fastställa ynglens stadier genom att studera framträdande morfologiska kännetecken. Tabellen nedan kan användas för att förenkla och standardisera bestämningen av utvecklingsstadier under hela studien eftersom den fastställer de framträdande morfologiska kännetecken som är förbundna med olika stadier, under förutsättning att utvecklingen är normal.

▼M6

Tabell 2.

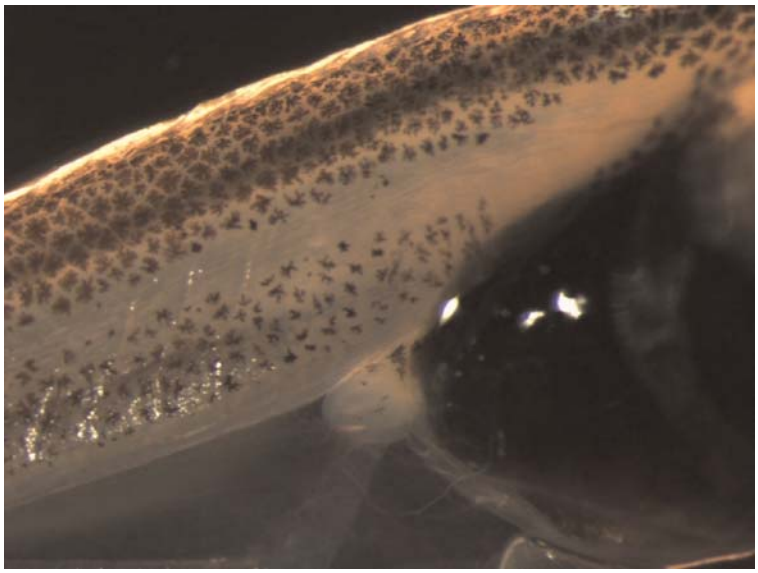
Framträdande morfologiska kännetecken för bestämning av utvecklingsstadier baserat på Nieuwkoop och Fabers vägledning.

Framträdande morfologiska kännetecken	Utvecklingsstadium															
	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66
Bakben	X	X	X	X	X	X	X									
Framben						X	X	X	X	X						
Kraniofacial struktur										X	X	X	X			
Luktnervens morfologi											X	X	X			
Svanslängd													X	X	X	X

23. För att testet ska kunna inledas bör alla grodyngel befinna sig i stadium 51. Den mest framträdande morfologiska kännetecknet för detta stadium är bakbenets morfologi, som visas i figur 1.

Figur 1.

Bakbenets morfologi i stadium 51 för yngel av arten *X. laevis*.



24. Utöver val av utvecklingsstadium kan man även välja storlek på försöksdjuren (valfritt). För detta ändamål ska hela kroppslängden (inte längden från nos till kloak) mätas på dag 0 i ett delprov på ungefär 20 grodyngel i stadium 51 enligt Nieuwkoop och Faber. Efter beräkningen av den genomsnittliga kroppslängden för denna grupp av djur kan övre och nedre gränser för försöksdjurens hela kroppslängd bestämmas genom att man tillåter längder inom ett intervall på medelvärdet ± 3 mm (genomsnittliga värden för hela kroppslängdsintervallet varierar mellan 24,0 och 28,1 mm för grodyngel i stadium 51). Fastställandet av utvecklingsstadiet är dock den primära parametern vid bedömningen av huruvida varje försöksdjur är redo att delta i testet. Grodyngel som uppvisar kraftiga synliga missbildningar eller skador används inte i testet.

▼M6

25. Grodyngel som uppfyller de kriterier som beskrivs ovan hålls i ett akvarium med rent odlingsvatten till dess att bestämningen av utvecklingsstadium är färdig. När bestämningen av utvecklingsstadium är färdig fördelas ynglen slumpmässigt i akvarier för exponeringsbehandling tills varje akvarium innehåller 20 yngel. Varje akvarium ska därefter kontrolleras med avseende på djur med onormalt utseende (t.ex. skador, onormalt simbeteende, etc.). Grodyngel som uppenbart verkar sjuka eller skadade bör avlägsnas från behandlingsakvarierna och ersättas med nyutvalda yngel från samlingsakvariet.

Observationer

26. För mer ingående information om förfaranden vid testets slut och bearbetningen av grodynglen, se OECD:s vägledningsdokument om groddjurs sköldkörtelhistologi (*Guidance Document on Amphibian Thyroid Histology*) (9).

Mätningar, dag 7

27. På dag 7 avlägsnas fem slumpmässigt utvalda grodyngel per replikat från varje testakvarium. Detta slumpmässiga förfarande gör att det är lika sannolikt att varje enskild organism väljs ut. Detta kan uppnås genom att man använder en randomiseringsmetod men kräver att varje grodyngel fångas i ett nät. Grodyngel som inte valts ut återbördas till sitt ursprungliga akvarium och de utvalda grodynglen avlivas på ett humant sätt, t.ex. i 150 till 200 mg/l MS-222, tillräckligt buffrad med natriumbikarbonat för att uppnå pH 7,0. De avlivade grodynglen sköljs med vatten och torkas av, varefter kroppsvikten fastställs till närmaste hela milligram. Bakbenslängd, längden från nos till kloak, och utvecklingsstadium fastställs (med hjälp av ett binokulärt dissektionsmikroskop) för varje grodyngel.

Mätningar, dag 21 (testavslutning)

28. Vid testets slut (dag 21) avlägsnas de återstående grodynglen från testakvarierna och avlivas humant, t.ex. i 150 till 200 mg/l MS-222, tillräckligt buffrad med natriumbikarbonat enligt ovan. Grodynglen sköljs med vatten och torkas av, varefter kroppsvikten fastställs till närmaste hela milligram. Utvecklingsstadium, längd från nos till kloak och bakbenslängd mäts för varje grodyngel.

29. Alla yngel placeras i Davidsons fixativ i 48–72 timmar antingen som helkroppsprover eller som putsade huvudvävnadsprover innehållande underkäken för histologiska bedömningar. För histopatologiska undersökningar väljs sammanlagt fem grodyngel ut från varje replikatakvarium. Eftersom höjden på de follikulära cellerna är beroende av det stadium ynglen befinner sig i (10) är den lämpligaste urvalsmetoden för histologiska analyser att använda stadium-matchade individer när så är möjligt. För att välja ut stadium-matchade individer måste alla yngels utvecklingsstadium först fastställas innan urvalet och den därpå följande bearbetningen för datainsamling och konservering. Detta är nödvändigt eftersom de normala utvecklingsskillnaderna kommer att leda till olika fördelningar av stadier inom varje replikatakvarium.

30. Djur som valts ut för histopatologisk undersökning (n = 5 från varje replikat) bör matchas till medianstadiet i kontrollerna (samlade replikat) där så är möjligt. Om det finns replikatakvarier med fler än fem yngel i ett lämpligt stadium väljs fem yngel ut slumpmässigt.

▼M6

31. Om det finns replikatakvarier med färre än fem yngel i ett lämpligt stadium ska individer från det föregående eller efterföljande utvecklingsstadiet väljas ut slumpmässigt tills man har fem yngel totalt per replikat. Beslutet att välja ut ytterligare yngel från det föregående eller efterföljande utvecklingsstadiet bör baseras på en övergripande utvärdering av fördelningen av stadier i kontrollen och i de akvarier som utsatts för behandling med kemikalier. Detta betyder att ytterligare yngel bör tas från det föregående stadiet om den kemiska behandlingen är förbunden med en fördröjning av ynglens utveckling. Om den kemiska behandlingen är förbunden med en snabbare utveckling ska ytterligare yngel tas från det efterföljande utvecklingsstadiet.

32. Om det förekommer allvarliga förändringar av grodynglens utveckling på grund av behandling med en testkemikalie kan det eventuellt inte finnas någon överlappning i fördelningen av stadier mellan de akvarier som utsatts för kemiska behandlingar och det beräknade medianutvecklingsstadiet i kontrollen. Endast i dessa fall bör urvalsprocessen modifieras genom att man använder ett stadium som skiljer sig från kontrollens medianstadium för att uppnå ett stadium-matchat urval av yngel för histopatologiska undersökningar av sköldkörteln. Om stadierna är obestämbara (dvs. asynkrona) bör fem grodyngel från varje replikat väljas ut slumpmässigt för histologisk undersökning. Den logiska grunden för urval av de yngel som inte befinner sig i ett stadium som motsvarar kontrollens medianutvecklingsstadium bör anges.

Bestämning av biologiska endpoints

33. Under den 21 dagar långa exponeringsfasen mäts primära endpoints på dag 7 och dag 21, men det är nödvändigt att observera djuren dagligen. I tabell 3 ges en översikt över de endpoints som ska mätas och motsvarande observationstidpunkter. Mer detaljerad information om de tekniska förfarandena för mätning av apikala endpoints och histologiska bedömningar finns i OECD:s vägledningsdokument (9).

Tabell 3.

Observationstidpunkter för primära endpoints i testet på groddjursmetamorfos.

Apikala endpoints	Dagligen	Dag 7	Dag 21
— Dödlighet	•		
— Utvecklingsstadium		•	•
— Bakbenslängd		•	•
— Längd från nos till kloak		•	•
— Kroppens våtvikt		•	•
— Sköldkörtelns histologi			•

▼M6

Apikala endpoints

34. Utvecklingsstadium, bakbenslängd, längd från nos till kloak och våtvikt är apikala endpoints för testet på groddjursmetamorfos, och varje endpoint diskuteras nedan i korthet. Ytterligare teknisk information för insamling av dessa uppgifter finns i de vägledande dokument som det hänvisas till, inbegripet de rekommenderade förfarandena för datorstödd analys.

Utvecklingsstadium

35. Utvecklingsstadiet för grodyngel av arten *X. laevis* bestäms med hjälp av Nieuwkoop och Fabers kriterier för bestämning av utvecklingsstadier (8). Uppgifter om utvecklingsstadier används för att fastställa om utvecklingen är accelererad, asynkron, försenad eller opåverkad. Accelererad eller försenad utveckling bestäms genom en jämförelse mellan de medianstadier som uppnåtts i kontroll- och behandlingsgrupperna. Asynkron utveckling rapporteras när de undersökta vävnaderna inte är deformerade eller onormala men de relativa tidpunkterna för morfogenesen eller utvecklingen av olika vävnader är rubbade hos ett enda grodyngel.

Bakbenslängd

36. Differentieringen och tillväxten av bakbenen styrs av sköldkörtelhormoner och utgör viktiga utvecklingsmässiga kännetecken som redan använts vid fastställandet av utvecklingsstadierna. Bakbenens utveckling används kvalitativt vid fastställandet av utvecklingsstadier, men bedöms här som en kvantitativ endpoint. Bakbenslängden mäts därför som endpoint för att upptäcka påverkan på sköldkörtelaxeln (figur 2). För konsekvensens skull mäts bakbenslängden på vänster bakben. Bakbenslängden utvärderas både på testets dag 7 och dag 21. På dag 7 är det enkelt att mäta bakbenens längd, enligt illustration i figur 2. Det är dock svårare att mäta bakbenens längd på dag 21 på grund av att benet då är böjt. Därför ska bakbenslängden på dag 21 mätas från kroppsväggen och följa mittlinjen på benet genom alla kantiga avvikelser. Förändringar i bakbenslängden på dag 7, även om de inte är uppenbara på dag 21, anses ändå vara viktiga för den potentiella sköldkörtelaktiviteten. Längdmätningar tas från digitala fotografier med hjälp av bildanalysprogram i enlighet med beskrivningen i OECD:s vägledningsdokument om sköldkörtelns histopatologi hos groddjur (*Guidance Document on Amphibian Thyroid Histology*) (9).

Kroppslängd och våtvikt

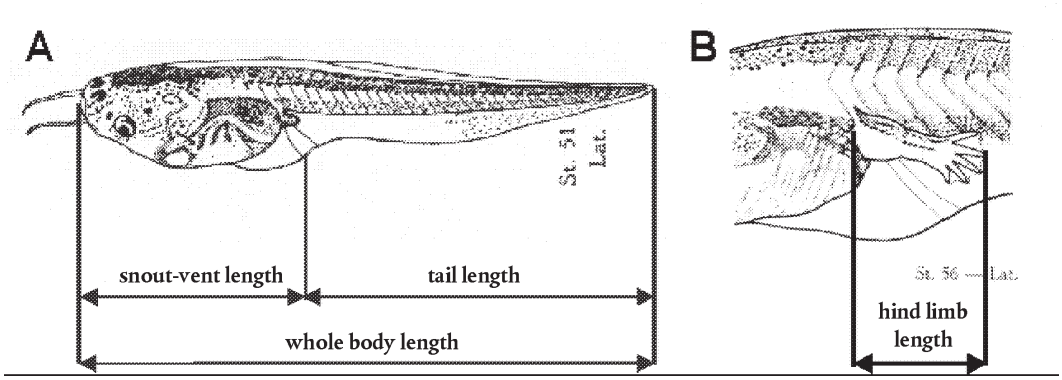
37. Bestämningar av längd från nos till kloak (figur 2) och våtvikt ingår i testprotokollet för att bedöma eventuella effekter av testkemikalier på tillväxttakten hos grodyngel jämfört med tillväxttakten i kontrollgruppen och är mycket värdefulla för att spåra testkemikaliens allmänna toxicitet. Eftersom avlägsnandet av vatten på kroppen för viktkontroller kan orsaka stress och hudskador hos grodynglen, utförs dessa mätningar på grodynglen i delprovet på dag 7 och på alla återstående grodyngel i slutet av testet (dag 21). För konsekvensens skull anses den kraniala kanten av kloaken utgöra svansens gräns vid mätningen.

38. Längden från nos till kloak används för att utvärdera grodynglens tillväxt såsom visas i figur 2.

▼M6

Figur 2.

(A) Olika typer av mätningar av kroppslängden och (B) mätningar av bakbenslängden för grodyngel av arten *X. laevis* (1).



Sköldkörtelns histologi

39. Utvecklingsstadium och bakbenslängd är viktiga endpoints för att bedöma exponeringsrelaterade förändringar i den metamorfa utvecklingen, men förseningar i utvecklingen kan i sig inte anses vara en diagnostisk indikator på sköldkörtelhämmande aktivitet. Vissa ändringar är endast iakttagbara vid en rutinmässig histopatologisk analys. Diagnostiska kriterier inbegriper förstorad/förminskad sköldkörtel, förstorade follikulära celler, follikulär hyperplasi och, som ytterligare kvalitativa kriterier, storleken på follikulära lumen, kolloidkvaliteten och de follikulära cellernas höjd/form. Allvarlighetsgrad (4 grader) bör rapporteras. Information om hur man erhåller och hanterar prover för histologisk undersökning och hur man utför histologiska analyser av vävnadsprover finns i *Amphibian Metamorphosis Assay: Part 1 – Technical guidance for morphologic sampling and histological preparation* och *Amphibian Metamorphosis Assay: Part 2 – Approach to reading studies, diagnostic criteria, severity grading and atlas* (9). Laboratorier som utför detta test för första gången bör söka råd från erfarna patologer i utbildningssyfte innan den histologiska analysen och utvärderingen av sköldkörteln påbörjas. Tydliga och viktiga ändringar i apikala endpoints som pekar på accelererad utveckling eller utvecklingsmässig asynkroni kan leda till att behovet av histopatologisk analys av sköldkörteln försvinner. En avsaknad av tydliga morfologiska förändringar eller tecken på försenad utveckling motiverar dock utförandet av histologiska analyser.

Dödlighet

40. I alla testakvarier bör man dagligen kontrollera förekomsten av döda grodyngel, och antalet bör registreras för varje akvarium. Datum, koncentration och akvarienummer anges vid alla observationer av dödlighet. Döda djur tas bort från testakvariet så snart de har upptäckts. En dödlighet som överstiger 10 % kan vara tecken på olämpliga testbetingelser eller på testkemikaliens toxiska effekter.

Övriga anmärkningar

41. Exempel på onormalt beteende och tydligt synliga missbildningar och skador registreras. Datum, koncentration och akvarienummer anges vid alla observationer av onormala beteenden, grova missbildningar eller skador. Normalt beteende kännetecknas av att grodynglen simmar fritt i vattenpelaren med svansen något högre än huvudet och med regelbundna

▼M6

rytmiska slag med svansen, att de periodvis stiger till ytan, rör på gällocken när de andas och reagerar på stimulus. Onormalt beteende kan till exempel omfatta att ynglen flyter på ytan eller ligger på botten av akvariet, simmar upp och nedvända eller med ojämna rörelser, inte går upp till ytan, och inte reagerar på stimulus. Dessutom bör stora skillnader i foderintaget mellan de olika behandlingarna registreras. Grova missbildningar och skador kan omfatta morfologiska abnormiteter (t.ex. missbildningar av armar och ben), blödande sår, bakteriella infektioner eller svampinfektioner, för att bara nämna några få. Dessa bestämningar är kvalitativa och bör betraktas som motsvarigheter till kliniska tecken på sjukdom eller stress, och ska göras i jämförelse med kontrolldjuren. Om förekomsten eller frekvensen är större i exponerade akvarier än i kontrollerna bör detta betraktas som bevis på uppenbar toxicitet.

DATA OCH RAPPORTERING

Datainsamling

42. Alla uppgifter bör samlas in med hjälp av elektroniska eller manuella system som överensstämmer med god laboratoriesed. Studiedata bör omfatta följande:

Testkemikalie:

— beskrivning av testkemikalien: fysikalisk-kemiska egenskaper, information om stabilitet och biologisk nedbrytbarhet,

— kemisk information och kemiska uppgifter: metod och frekvens för beredning av utspädningar. Informationen om testkemikalien omfattar faktiska och nominella koncentrationer av testkemikalien och i vissa fall metaboliten, beroende på vad som är lämpligt. Mätningar av testkemikalien kan krävas för stamlösningar och testlösningar,

— lösningsmedel (annat än vatten): motivering av valet av lösningsmedel, och beskrivning av lösningsmedlet (beskaffenhet, den använda koncentrationen).

Testbetingelser:

— operativa uppgifter: observationer som rör hur väl testsystemet, laboratoriemiljön och infrastrukturen fungerar. Typiska uppgifter inbegriper omgivande temperatur, testtemperatur, fotoperiod, status för de viktiga komponenterna i exponeringssystemet (t.ex. pumpar, räknare för cykler, tryck), flödeshastigheter, vattennivåer, byten av flaskor med stamlösning och utfodringsuppgifter. Allmänna parametrar för vattenkvaliteten inbegriper pH-värde, halt av löst syre, konduktivitet, total jodhalt, alkalinitet, hårdhet,

— avvikelser från testmetoden: denna information bör innehålla uppgifter om eller eventuella förklarande beskrivningar av avvikelser från testmetoden.

Resultat:

— biologiska observationer och uppgifter: dessa inkluderar dagliga observationer av dödlighet, foderintag, onormalt simbeteende, letargi, förlust av balansen, missbildningar, skador osv. Observationer och uppgifter som samlas in vid förutbestämda intervall omfattar följande: utvecklingsstadium, bakbenslängd, längd från nos till kloak samt våtvikt,

▼M6

— statistiska analystekniker och motivering av de tekniker som använts, statistiska analysresultat, helst i tabellform,

— histologiska uppgifter: dessa innehåller förklarande beskrivningar samt allvarlighetsgrad och frekvens för särskilda observationer, enligt beskrivningen i vägledningsdokumentet för histopatologi,

— särskilda observationer: dessa observationer bör inbegripa förklarande beskrivningar av undersökningen som inte passar in i de tidigare angivna kategorierna.

Rapportering av uppgifter

43. Tillägg 2 innehåller kalkylblad för daglig datainsamling som kan användas som vägledning för notering av rådata och för beräkning av sammanfattande statistik. Dessutom tillhandahålls rapporteringstabeller som är lämpliga för inrapportering av sammanfattningar av endpointdata. Rapporteringstabeller för histologiska bedömningar finns i tillägg 2.

Utförandekriterier och testets godtagbarhet och giltighet

44. I allmänhet kommer stora avvikelser från testmetoden att resultera i uppgifter som inte går att använda för tolkning och rapportering. Därför har följande kriterier i tabell 4 utarbetats som vägledning för att fastställa kvaliteten på det utförda testet och hur väl bruket av kontrollorganismerna har fungerat i allmänhet.

Tabell 4.

Utförandekriterier för testet på groddjursmetamorfos.

Kriterium	Godtagbara gränser
Testkoncentrationer	Bibehålls vid ≤ 20 % CV (variationer av den uppmätta testkoncentrationen) under testets 21 dagar
Dödlighet i kontrollerna	≤ 10 % – dödligheten i ett enskilt replikat i kontrollerna bör inte överstiga två grodyngel
Minsta medianutvecklingsskede i kontrollerna vid testets avslutning	57
Fördelning av utvecklingsstadierna i kontrollgruppen	Den 10:e och den 90:e percentilen i utvecklingsfasfördelningen bör inte skilja sig åt med mer än fyra stadier
Löst syre	≥ 40 % luftmättnad (*)
pH-värde	pH-värdet bör hållas mellan 6,5 och 8,5. Skillnaderna mellan olika replikat och mellan olika testkärl bör inte överstiga 0,5.
Vattentemperatur	22 ± 1 °C – skillnaderna mellan olika replikat och mellan olika testkärl bör inte överstiga 0,5 °C.
Testkoncentrationer utan uppenbar toxicitet	≥ 2
Resultat, replikaten	≤ 2 replikat från testet som helhet kan gå förlorade

▼M6

Kriterium	Godtagbara gränser
Särskilda villkor för användning av ett lösningsmedel	Om ett lösningsmedel används som bärämne bör både en lösningsmedelskontroll och en kontroll med rent vatten användas och resultaten rapporteras
	Statistiskt signifikanta skillnader mellan lösningsmedels- och vattenkontrollgrupper behandlas för sig. Se nedan för mer information
Särskilda villkor för statiska förnyelsesystem	Representativa kemiska analyser som utförs före och efter förnyelsen bör rapporteras
	Ammoniaknivåerna ska mätas omedelbart före förnyelsen
	Alla parametrar för vattenkvalitet som anges i tabell 1 i tillägg 1 bör mätas omedelbart före förnyelsen
	Förnyelseperioden bör inte överstiga 72 timmar
	Lämpligt utfodringsschema (50 % av den dagliga fodergivan av kommersiellt tillgängligt grodyngelfoder)

(*) Luftningen av vattnet kan upprätthållas med hjälp av syrestenar. Det rekommenderas att syrestenarna fästs på nivåer som inte skapar onödig stress för grodynglen.

Testets giltighet

45. Följande krav måste vara uppfyllda för att ett test ska anses vara godtagbart/giltigt:

Giltigt försök i ett test som fastställs vara negativt med avseende på sköldkörtelaktiviteten:

(1) Dödligheten får inte överstiga 10 % för ett givet testkärl (inklusive kontroller). Dödligheten får inte överstiga tre grodyngel för ett givet replikat, annars anses replikatet ha gått förlorat.

(2) Minst två behandlingsnivåer med alla fyra giltiga replikat bör finnas tillgängliga för analys.

(3) Minst två behandlingsnivåer utan uppenbar toxicitet bör finnas tillgängliga för analys.

Giltigt försök i ett test som fastställs vara positivt med avseende på sköldkörtelaktiviteten:

(1) En dödlighet på högst två grodyngel/replikat i kontrollgruppen får förekomma.

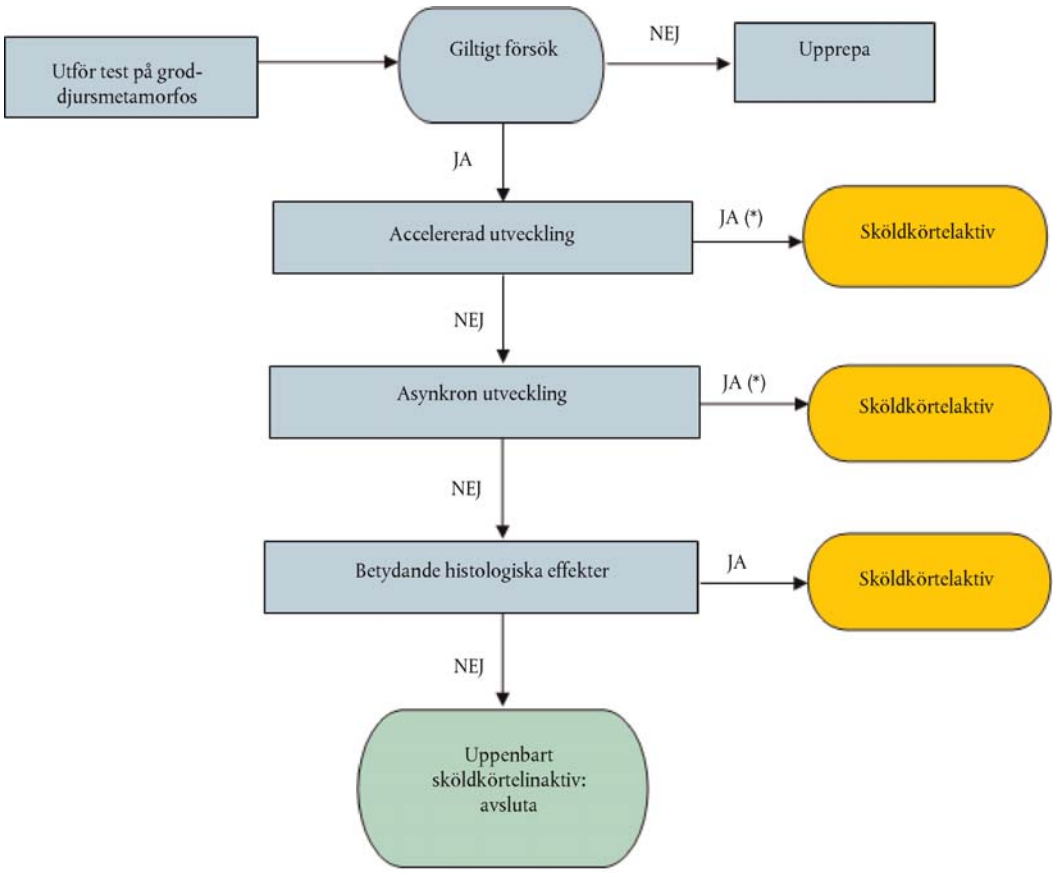
Beslutsgången för genomförandet av testet på groddjursmetamorfos

46. Beslutsgången utarbetades för testet på groddjursmetamorfos för att tillhandahålla logisk hjälp med genomförandet och tolkningen av resultaten från biotestet (se flödesdiagram i figur 3). Beslutsgången väger i huvudsak endpoints mot varandra i det att accelererad utveckling, asynkron utveckling och sköldkörtelns histopatologi är av stor vikt, medan fördröjd utveckling, längd från nos till kloak och våt kroppsvikt, parametrar som potentiellt kan påverkas av den allmänna toxiciteten, är av mindre vikt.

▼M6

Figur 3.

Beslutsgången för testet på groddjursmetamorfos.



(*) Histologisk bedömning kan krävas av vissa tillsynsmyndigheter trots att det finns stora skillnader mellan accelererad och asynkron utveckling. Den enhet eller person som utför detta test uppmanas att samråda med de myndigheter som krävs före testets utförande för att bestämma vilka endpoints som krävs.

Accelererad utveckling (bestäms på basis av utvecklingsstadium, längd från nos till kloak och bakbenslängd)

47. Accelererad utveckling inträffar endast genom effekter som är sköldkörtelhormonrelaterade. Dessa kan utgöras av perifera vävnadseffekter såsom direkt interaktion med sköldkörtelhormonreceptorn (t.ex. T4) eller effekter som förändrar nivåerna av cirkulerande sköldkörtelhormon. I vilket fall som helst kan detta betraktas som tillräckliga bevis för att kemikalien framkallar sköldkörtelaktivitet. Accelererad utveckling utvärderas på ett av två möjliga sätt. Det ena är att det allmänna utvecklingsstadiet kan bedömas med hjälp av standardmetoden som beskrivits i Nieuwkoop och Faber (8). Det andra är att särskilda morfologiska egenskaper kan kvantifieras, t.ex. bakbenslängden, både på dag 7 och 21, vilket är förenat med agonistiska effekter på sköldkörtelhormonreceptorn. Om statistiskt signifikanta accelerationer av utvecklingen eller bakbenslängden inträffar visar testet att kemikalien är sköldkörtelaktiv.

▼**M6**

48. Utvärderingen av försöksdjur med avseende på accelererad utveckling i förhållande till kontrollpopulationen bygger på resultaten av statistiska analyser som utförs med inriktning på följande fyra endpoints:

— bakbenslängden (normaliserad genom längden från nos till kloak) på testdag 7,

— bakbenslängden (normaliserad genom längden från nos till kloak) på testdag 21,

— utvecklingsstadiet på testdag 7,

— utvecklingsstadiet på testdag 21.

49. Statistiska analyser av bakbenslängden bör utföras på grundval av mätningar av det vänstra bakbenets längd. Bakbenslängden normaliseras genom att fastställa förhållandet mellan bakbenslängden och längden från nos till kloak för varje individ. Medelvärdet av de normaliserade värdena för varje behandlingsnivå jämförs därefter. En accelererad utveckling utvisas då av en betydande ökning av den genomsnittliga bakbenslängden (normaliserad) i en kemikaliebehandlingsgrupp jämfört med kontrollgruppen på testdag 7 och/eller testdag 21 (se tillägg 3).

50. Statistiska analyser av utvecklingsstadier bör utföras på grundval av fastställandet av utvecklingsstadier enligt de morfologiska kriterier som beskrivits av Nieuwkoop och Faber (8). En accelererad utveckling anges när en ”multikvantal” analys påvisar en avsevärd ökning av värdena för utvecklingsstadier i en kemikaliebehandlingsgrupp jämfört med kontrollgruppen på testdag 7 och/eller 21.

51. I metoden för testet på groddjursmetamorfos anses en betydande effekt på någon av de fyra ovannämnda endpoints vara tillräckligt för att man ska kunna fastställa förekomsten av accelererad utveckling. Betydande effekter på bakbenslängden vid en viss tidpunkt behöver alltså inte bekräftas av betydande effekter på bakbenslängden vid den alternativa tidpunkten eller av betydande effekter på utvecklingsstadierna vid denna särskilda tidpunkt. Betydande effekter på utvecklingsstadiet vid en viss tidpunkt behöver i sin tur inte bekräftas av betydande effekter på utvecklingsstadiet på den alternativa tidpunkten eller av betydande effekter på bakbenslängden vid denna särskilda tidpunkt. Beviskraften för accelererad utveckling ökar dock om betydande effekter påvisas för mer än en endpoint.

Asynkron utveckling (fastställs med hjälp av kriterier för utvecklingsstadier)

52. Asynkron utveckling kännetecknas av störningar i de relativa tidpunkterna för morfogenesen eller utvecklingen av olika vävnader hos ett enda grodyngel. Oförmåga att tydligt fastställa utvecklingsstadiet hos en organism med hjälp av den uppsättning morfologiska endpoints som anses typiska för ett visst stadium antyder att vävnaderna utvecklas asynkront genom metamorfosen. Asynkron utveckling är en indikator för sköldkörtelaktivitet. De enda kända verkningssätt som orsakar asynkron utveckling är effekterna av kemikalier på den perifera sköldkörtelhormonaktiviteten och/eller på metabolismen av sköldkörtelhormon i vävnader under utveckling, såsom kan observeras med deiodinashämmare.

▼**M6**

53. Utvärderingen av försöksdjuren med avseende på förekomsten av asynkron utveckling i förhållande till kontrollpopulationen ska grundas på en makromorfologisk bedömning av försöksdjuren på testdag 7 och testdag 21.

54. Nieuwkoop och Fabers (8) beskrivning av den normala utvecklingen hos *Xenopus laevis* utgör en ram för fastställande av ordningsföljden för den normala ombildningen av vävnader. Termen ”asynkron utveckling” refererar särskilt till avvikelser i grodynglens makromorfologiska utveckling som gör det omöjligt att fastställa ett utvecklingsstadium enligt kriterierna i Nieuwkoop och Faber (8), eftersom viktiga morfologiska kännetecken har särdrag som är typiska för olika stadier.

55. Termen ”asynkron utveckling” innebär att endast fall som uppvisar avvikelser i omvandlingsförloppet för vissa vävnader i förhållande till omvandlingsförloppet för andra vävnader bör övervägas. I vissa klassiska fenotyper förekommer försening eller avsaknad av utvecklingen av framben trots normal eller accelererad utveckling av vävnaderna i bakben och svans, eller en tidig resorption av gälarna i förhållande till det stadium som morfogenesen för bakbenen och resorptionen av svansen befinner sig i. Man registrerar att ett djur uppvisar asynkron utveckling om det inte kan hänföras till ett stadium på grund av att det inte uppfyller en majoritet av de viktiga utvecklingsrelaterade kriterierna för ett visst stadium enligt Nieuwkoop och Faber (8), eller om en eller flera grundläggande egenskaper är extremt försenade eller accelererade (t.ex. om svansen helt har resorberats men frambenen inte har utvecklats). Denna bedömning görs kvalitativt och bör innefatta en undersökning av samtliga viktiga kännetecken som anges av Nieuwkoop och Faber (8). Det är dock inte nödvändigt att registrera utvecklingsstadiet för dessa olika viktiga kännetecken för de djur som undersöks. Djur som har registrerats som asynkront utvecklade hänförs inte till ett utvecklingsstadium enligt Nieuwkoop och Faber (8).

56. Ett centralt kriterium för att beteckna fall med onormal morfologisk utveckling som ”asynkron utveckling” är att de relativa tidpunkterna för utvecklingen eller morfogenesen av olika vävnader är rubbade men att de påverkade vävnadernas morfologi inte är uppenbart onormal. Ett exempel som illustrerar denna tolkning av makromorfologiska abnormiteter är att en försenad morfogenes av bakbenen i förhållande till utvecklingen av andra vävnader uppfyller kriterierna för ”asynkron utveckling”, men att fall där bakbenen saknas, onormalt utvecklade fingrar och tår (t.ex. ektrodaktyli, polydaktyli) eller andra synliga missbildningar förekommer inte bör betraktas som exempel på ”asynkron utveckling”.

57. De viktigaste morfologiska kännetecknen som i detta sammanhang bör utvärderas med avseende på deras samordnade metamorfa utveckling omfattar bakbenens morfogenes, utvecklingen av frambenen, stadiet under vilket svansen resorberas (särskilt resorptionen av svansfenan) och huvudets morfologi (t.ex. gälstorleken och resorptionen av gälarna, underkäkens morfologi, protrusionen av Meckels brosk).

58. Olika makromorfologiska fenotyper kan förekomma beroende på typen av kemiskt verkningssätt. I vissa klassiska fenotyper förekommer försening eller avsaknad av utvecklingen av framben trots normal eller accelererad utveckling av vävnaderna i bakben och svans, eller en tidig resorption av gälarna i förhållande till omvandlingen av bakben och svans.

▼M6

Histopatologi

59. Om kemikalien inte orsakar uppenbar toxicitet och inte accelererar utvecklingen eller orsakar asynkron utveckling, utvärderas sköldkörtelns histopatologi med hjälp av lämpliga vägledningsdokument (9). Utvecklingsstörningar i frånvaron av toxicitet är ett tydligt tecken på sköldkörtelhämmande aktivitet, men analysen av utvecklingsstadier är mindre känslig och mindre diagnostisk än en histopatologisk undersökning av sköldkörteln. Därför är det i detta fall nödvändigt att utföra histopatologiska analyser av sköldkörteln. Effekter på sköldkörtelns histologi har påvisats i frånvaro av effekter på utvecklingen. Om det förekommer förändringar av sköldkörtelns histopatologi anses kemikalien vara sköldkörtelaktiv. Om inga förseningar i utvecklingen eller sjukliga histologiska förändringar i sköldkörteln observeras anses kemikalien vara sköldkörtelinaktiv. Den logiska grunden för detta beslut är att sköldkörteln påverkas av TSH (tyreoideastimulerande hormon), och alla kemikalier som har tillräckligt stor effekt på cirkulerande sköldkörtelhormon för att ändra utsöndringen av TSH leder till histopatologiska förändringar i sköldkörteln. Olika verkningssätt och -mekanismer kan ändra cirkulerande sköldkörtelhormon. Nivån av sköldkörtelhormon vittnar om en sköldkörtelrelaterad effekt, men detta är alltså inte tillräckligt för att avgöra vilka verkningssätt eller verkningsmekanismer som står i samband med responsen.

60. Eftersom man inte kan använda sig av grundläggande statistiska metoder när det gäller denna endpoint kan man fastställa att en effekt inträffar som är förknippad med exponeringen för kemikalien genom ett expertutlåtande från en patolog.

Fördröjd utveckling (bestäms på basis av utvecklingsstadium, bakbenslängd, kroppsvikt och längd från nos till kloak)

61. Fördröjd utveckling kan inträffa på grund av sköldkörtelhämmande mekanismer och på grund av indirekt toxicitet. Små förseningar i utvecklingen tillsammans med tydliga tecken på toxicitet tyder sannolikt på icke-specifika toxiska effekter. Utvärderingen av toxicitet som inte påverkar sköldkörteln är en viktig del av testet som minskar sannolikheten för falskt positiva resultat. En överdrivet hög dödlighet är ett tydligt tecken på närvaron av andra toxiska mekanismer. På samma sätt tyder små minskningar i tillväxten, som bestämts av våtvikten och/eller längden från nos till kloak, också på toxicitet som inte påverkar sköldkörteln. Tydliga ökningar i tillväxten observeras ofta med kemikalier som påverkar den normala utvecklingen negativt. Följaktligen tyder förekomsten av djur med större storlek inte nödvändigtvis på toxicitet som inte påverkar sköldkörteln. Man bör dock inte enbart förlita sig på tillväxten för att fastställa sköldkörteltoxicitet. Man bör hellre använda tillväxten, i kombination med utvecklingsstadier och sköldkörtelns histopatologi, för att fastställa sköldkörtelaktivitet. Andra endpoints bör också beaktas för att fastställa tydlig toxicitet, inklusive ödem, blödande sår, letargi, minskat foderintag, erratiskt/förändrat simbeteende, etc. Om alla testkoncentrationer uppvisar tecken på uppenbar toxicitet bör testkemikalien utvärderas på nytt vid lägre testkoncentrationer innan man fastställer om kemikalien är potentiellt sköldkörtelaktiv eller sköldkörtelinaktiv.

62. I frånvaro av andra tecken på uppenbar toxicitet tyder statistiskt signifikanta förseningar i utvecklingen på att kemikalien är sköldkörtelaktiv (antagonistisk). I avsaknad av tydliga statistiska responser kan detta resultat kompletteras med resultat från sköldkörtelns histopatologi.

▼M6

Statistiska analyser

63. Statistiska analyser av data bör helst följa de förfaranden som beskrivs i dokumentet *Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application* (11). För alla kontinuerliga kvantitativa endpoints (bakbenslängd, längd från nos till kloak, våtvikt) som är förenliga med en monoton dos-respons bör Jonckheere-Terpstras test tillämpas på step-down-grund för att fastställa en betydande behandlingseffekt.

64. För alla kontinuerliga kvantitativa endpoints som inte är förenliga med en monoton dos-respons bör erhållna data bedömas med avseende på normalitet (helst med hjälp av Shapiro-Wilks test eller Anderson-Darlings test) och på varianshomogenitet (helst med hjälp av Levenes test). Båda testerna utförs på residualerna från en variansanalys (ANOVA). Expertbedömning kan användas i stället för dessa formella tester med avseende på normalitet och varianshomogenitet, även om de formella testerna är att föredra. Om resultaten visar på icke-normalitet eller variansheterogenitet bör man försöka göra en variansstabiliserande omvandling. Om erhållna data (kanske efter en omvandling) är normalfördelade med homogen varians kan en signifikant behandlingseffekt fastställas med hjälp av Dunnetts test. Om erhållna data (kanske efter en omvandling) är normalfördelade med heterogen varians kan en signifikant behandlingseffekt fastställas med hjälp av Tamhane-Dunnetts test, även kallat T3, eller Mann-Whitney-Wilcoxons U-test. Om det inte går att finna någon normaliserande omvandling kan en signifikant behandlingseffekt fastställas med hjälp av Mann-Whitney-Wilcoxons U-test med en Bonferroni-Holm-justering av p-värdena. Dunnetts test tillämpas oberoende av eventuella ANOVA (F-test), och Mann-Whitneys test tillämpas oberoende av eventuella övergripande Kruskall-Wallis test.

65. Signifikant dödlighet är inte ett väntevärde utan bör bedömas utifrån ett step-down-grundat Cochran-Armitages test om erhållna data överensstämmer med dos-responsmonotoniteten, och i annat fall utifrån Fishers exakta test med en Bonferroni-Holm-justering.

66. En signifikant behandlingseffekt med avseende på utvecklingsstadium fastställs genom step-down-tillämpningen av Jonckheere-Terpstras test, tillämpat på replikatens medianvärden. Alternativt, och företrädesvis, bör ett ”multikvantalt” Jonckheeres test från den 20:e till den 80:e percentilen användas för bestämning av effekten, eftersom det tar hänsyn till förändringar av fördelningsprofilen.

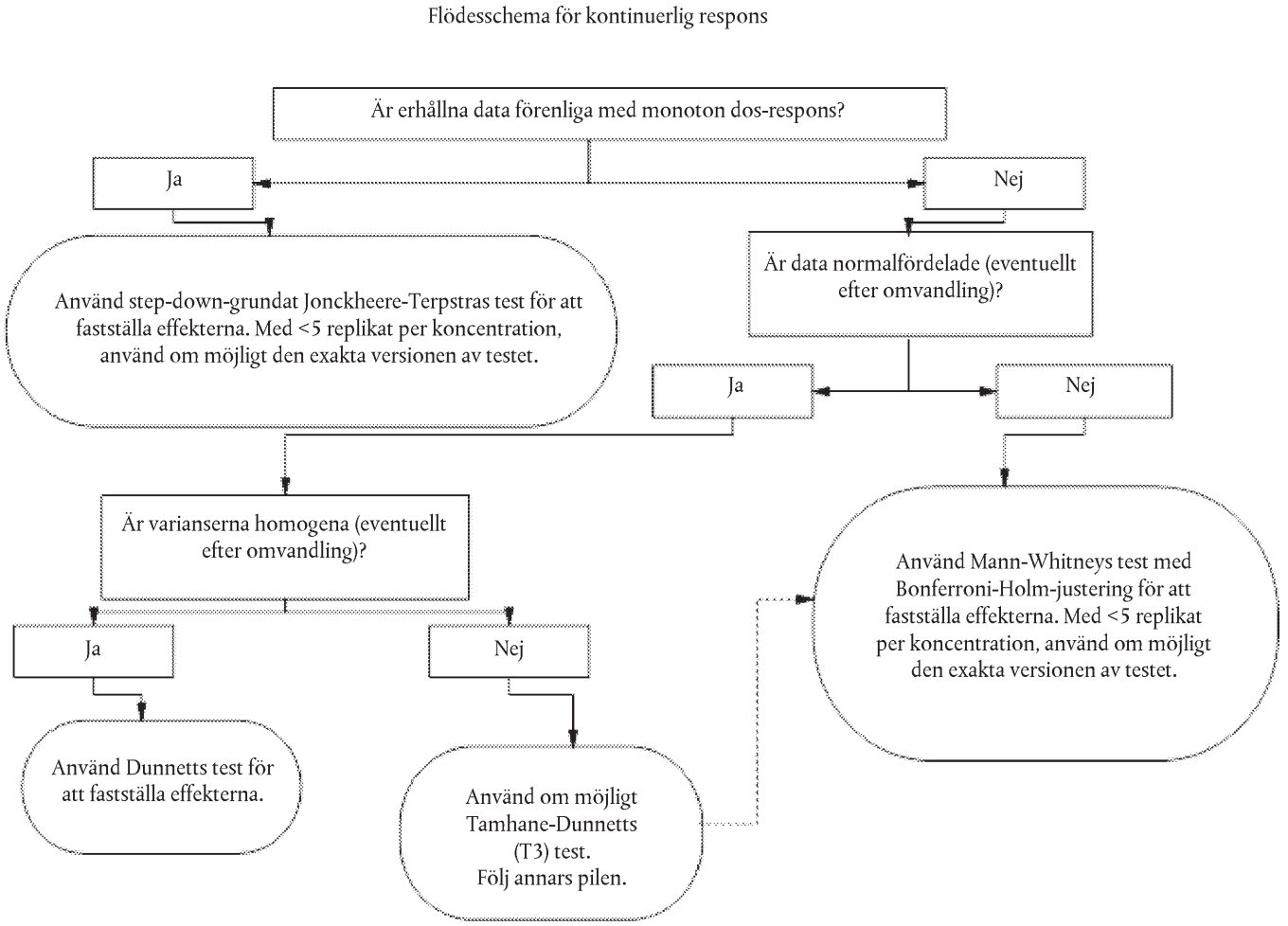
67. Den lämpliga analysenheten är replikatet, så data består av replikatens medianvärden om Jonckheere-Terpstras test eller Mann-Whitneys u-test används, eller replikatens medelvärden om Dunnetts test används. Dos-responsmonotonitet kan bedömas visuellt utifrån replikatens och testkärlens medelvärden eller medianvärden eller utifrån formella test så som beskrivits ovan (11). Med färre än fem replikat per testkärl eller kontroll bör man om möjligt använda den exakta/randomiserade versionen av Jonckheere-Terpstras test och Mann-Whitneys test. Den statistiska signifikansen av alla de angivna testerna bedöms på signifikansnivå 0,05.

68. Figur 4 är ett flödesschema över utförande av statistiska tester på kontinuerliga data.

▼M6

Figur 4.

Flödesschema över statistiska metoder för kontinuerliga responsdata.



▼M6

Särskilda överväganden för dataanalys

Användning av behandlingsnivåer som inte gått förlorade

69. Flera faktorer ska beaktas när man fastställer huruvida ett replikat eller en hel behandling uppvisar uppenbar toxicitet och bör avlägsnas ur analysen. Uppenbar toxicitet definieras som > 2 dödsfall i varje enskilt replikat som endast kan förklaras av toxicitet snarare än av tekniska fel. Andra tecken på uppenbar toxicitet omfattar blödning, onormala beteenden, onormala simmönster, anorexi och andra kliniska tecken på sjukdom. För subletala tecken på toxicitet kan det bli nödvändigt att göra kvalitativa utvärderingar, och dessa bör alltid göras i jämförelse med kontrollgruppen med rent vatten.

Kontroller med lösningsmedel

70. Användningen av lösningsmedel bör endast ses som en sista utväg när alla andra alternativ för kemiska bärämnen har övervägts. Om lösningsmedel används ska man samtidigt ha en kontroll med rent vatten. I slutet av testet bör en utvärdering göras av lösningsmedlets eventuella effekter. Detta görs genom en statistisk jämförelse av kontrollgruppen med lösningsmedel och kontrollgruppen med rent vatten. De mest relevanta endpoints som ska beaktas i denna analys är utvecklingsstadier, längd från nos till kloak och våtvikt, eftersom dessa kan påverkas av toxicitet som inte påverkar sköldkörteln. Om statistiskt signifikanta skillnader med avseende på dessa endpoints påvisas mellan kontrollen med rent vatten och kontrollgruppen med lösningsmedel ska studiens endpoints för responsmåtten fastställas med hjälp av kontrollen med rent vatten. Om det inte finns några statistiskt signifikanta skillnader mellan kontrollen med rent vatten och kontrollerna med lösningsmedel för alla uppmätta responsvariabler ska studiens endpoints för responsmåtten fastställas med hjälp av de sammanlagda kontrollerna med utspädningsvatten och lösningsmedel.

Behandlingsgrupper som uppnår utvecklingsstadium 60 och däröver

71. Efter stadium 60 minskar grodynglen i storlek och vikt på grund av vävnadsresorption och minskning av den absoluta vattenhalten. Mätningar av våtvikt och längd från nos till kloak kan således inte användas på lämpligt sätt i de statistiska analyserna av skillnader i tillväxttakt. Våtvikt och längddata från organismer > stadium 60 enligt Nieuwkoop och Faber bör därför strykas och kan inte användas vid analyser av replikatmedelvärden eller replikatmedianvärden. Två olika metoder kan användas för att analysera dessa tillväxtrelaterade parametrar.

72. En metod är att endast beakta grodyngel som är i utvecklingsstadium 60 eller tidigare för statistiska analyser av våtvikt och/eller längd från nos till kloak. Denna metod anses ge tillräckligt tillförlitlig information om de möjliga tillväxteffekternas allvarlighetsgrad förutsatt att bara en liten andel av försöksdjuren avlägsnas från analyserna (≤ 20 %). Om ett ökat antal grodyngel utvecklas bortom stadium 60 (≥ 20 %) i en eller flera nominella koncentrationer bör en tvåfaktors ANOVA med en nästlad (hierarkisk) variansstruktur utföras för samtliga grodyngel för att bedöma tillväxteffekter som beror på kemiska behandlingar, samtidigt som man tar hänsyn till den effekt de senare utvecklingsstadierna har på tillväxten. Tillägg 3 innehåller vägledning om tvåfaktors variansanalys av vikt och längd.

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. Nr 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. Nr 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. Nr 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. Nr 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) Kahl, M. D., Russom, C. L., DeFoe, D. L. och Hammermeister, D. E. (1999) Saturation units for use in aquatic bioassays. Chemosphere 39, s. 539–551.

(8) Nieuwkoop, P. D. och Faber, J. (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. Nr 82. Paris.

(10) Dodd, M. H. I. och Dodd, J. M. (1976) The Biology of Metamorphosis. I: Physiology of Amphibia. Lofts, B. (red.), 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. Nr 54. Paris.

(12) Hutchinson, T. H., Shillabeer, N., Winter, M. J., Pickford, D. B. (2006) Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review. Review. Aquatic Toxicology, 76, s. 69–92.

▼M6

Tillägg 1

Tabell 1

Försöksbetingelser för det 21 dagar långa testet på groddjursmetamorfos

Försöksdjur		Yngel av *Xenopus laevis*	
Inledande yngelstadium		Stadium 51 enligt Nieuwkoop och Faber	
Exponeringstid		21 dagar	
Urvalskriterier, yngel		Utvecklingsstadium och total längd (frivilligt)	
Testkoncentrationer		Minst tre koncentrationer som spänner över ungefär en storleksordning	
Exponeringssystem		Genomflöde (föredras) och/eller statisk förnyelse	
Testsystemets flödeshastighet		25 ml/min (fullständig förnyelse av volymen ungefär per 2,7 timmar)	
Primära endpoints/Bestämningsdag		Dödlighet	Dagligen
		Utvecklingsstadium	Dag 7 och 21
		Bakbenslängd	Dag 7 och 21
		Längd från nos till kloak	Dag 7 och 21
		Våt kroppsvikt	Dag 7 och 21
		Sköldkörtelns histologi	Dag 21
Utspädningsvatten/Laboratoriekontroll		Avklorerat kranvatten (kolfiltrerat) eller motsvarande laboratoriekälla	
Yngeltäthet		20 larver per testkärl (5/l)	
Testlösning/Testkärl		4–10 l (10–15 cm minsta vattendjup)/Testkärl av glas eller rostfritt stål (t.ex. 22,5 cm × 14 cm × 16,5 cm)	
Replikation		Fyra replikattestkärl per testkoncentration och kontroll	
Godtagbar dödlighetsfrekvens i kontrollerna		≤ 10 % per replikattestkärl	
Sköldkörtelfixering	Antal fixerade	Samtliga grodyngel (fem per replikat utvärderas initialt)	
	Område	Huvudet eller hela kroppen	
	Fixermedel	Davidsons fixativ	
Utfodring	Foder	Sera Micron® eller motsvarande	
	Mängd/Frekvens	Se tabell 1 för utfodringsprogram med Sera Micron®	
Belysning	Fotoperiod	12 h ljus/12 h mörker	

▼**M6**

	Intensitet	600–2 000 lux (mätt vid vattenytan)
Vattentemperatur		22 ± 1 °C
pH-värde		6,5–8,5
Halt av löst syre		> 3,5 mg/l (>40 % luftmättnad)
Provtagningsschema, analytisk kemi		En gång per vecka (fyra provtagningar per test)

▼M6

Tillägg 2

Rapporteringstabeller för rådata och sammanställda data

Tabell 1

Allmän information om testkemikalien

Kemisk information			
	Ange testkemikalie, koncentrationsenheter och behandlingar		
	Testkemikalie:		
	Koncentrationsenheter:		
	Behandling 1		
	Behandling 2		
	Behandling 3		
	Behandling 4		
	Datum (dag 0):		Ange datum (dd/mm/åå)
	Datum (dag 7):		Ange datum (dd/mm/åå)
	Datum (dag 21):		Ange datum (dd/mm/åå)

Tabell 2

Insamlingsformulär för rådata för dagarna 7 och 21

DAG X
DATUM 00/00/00

	Koncentration	Behandlings-nummer	Replikat nummer	Individ nummer	Individuellt igenkännings-tecken	Utvecklings-stadium	Längd från nos till kloak (mm)	Bakbenslängd (mm)	Hela organismens våtvikt (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	Behandlings-nummer	Replikat nummer	Individ nummer	Individuellt igenkännings-tecken	Utvecklings-stadium	Längd från nos till kloak (mm)	Bakbenslängd (mm)	Hela organismens våtvikt (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	Behandlings-nummer	Replikat nummer	Individ nummer	Individuellt igenkännings-tecken	Utvecklings-stadium	Längd från nos till kloak (mm)	Bakbenslängd (mm)	Hela organismens våtvikt (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	Behandlings-nummer	Replikat nummer	Individ nummer	Individuellt igenkännings-tecken	Utvecklings-stadium	Längd från nos till kloak (mm)	Bakbenslängd (mm)	Hela organismens våtvikt (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

Tabell 3

Beräknade sammanfattningar för endpointdata från dag 7 och 21

		Utvecklingsstadium			Längd från nos till kloak (mm)		Bakbenslängd (mm)		Vikt (mg)	
TRT	REP	MIN	MEDIAN	MAX	MEAN	STD DEV	MEAN	STD DEV	MEAN	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!

Anmärkning: Cellberäkningarna bygger på införda data i tabell 2.

Tabell 4

Daglig dödlighet

Testdag	Datum	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
0	00/00/00																
1	#Value!																
2	#Value!																
3	#Value!																
4	#Value!																
5	#Value!																

▼**M6**

Testdag	Datum	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
6	#Value!																
7	#Value!																
8	#Value!																
9	#Value!																
10	#Value!																
11	#Value!																
12	#Value!																
13	#Value!																
14	#Value!																
15	#Value!																
16	#Value!																
17	#Value!																
18	#Value!																
19	#Value!																
20	#Value!																
21	#Value!																
Summa, replikat		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Summa, behandling		0				0				0				0			

Anmärkning: Cellberäkningarna bygger på införda data i tabell 1.

Tabell 5

Kriterier för vattenkvalitet

Exponeringssystem (genomflöde/statisk förnyelse):
Temperatur:
Ljusintensitet:
Ljus/mörkercykel:
Foder:
Utfodringsfrekvens:
Vattnets pH:
Jodkoncentration i testvattnet:

▼**M6**

Tabell 6

Sammanfattning, kemiska data

Kemiskt namn:																				
CAS-nummer:																				
Testdag	Datum	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	#Value!																				
2	#Value!																				
3	#Value!																				
4	#Value!																				
5	#Value!																				
6	#Value!																				
7	#Value!																				
8	#Value!																				
9	#Value!																				
10	#Value!																				
11	#Value!																				
12	#Value!																				
13	#Value!																				
14	#Value!																				
15	#Value!																				
16	#Value!																				
17	#Value!																				
18	#Value!																				
19	#Value!																				
20	#Value!																				
21	#Value!																				

Anmärkning: Cellberäkningarna bygger på införda data i tabell 1.

▼**M6**

Tabell 7

Histopatologiska rapporteringstabeller för kärnkriterier

Datum: Kemikalie: Patolog:

		Förstorad sköldkörtel	Förminskad sköldkörtel	Förstorade follikulära celler	Follikulär hyperplasi
ID, kontrolldjur – replikat 1					
ID, kontrolldjur – replikat 2					
Totalt:					

		Förstorad sköldkörtel	Förminskad sköldkörtel	Förstorade follikulära celler	Follikulär hyperplasi
ID, doserat djur – replikat 1					
ID, doserat djur – replikat 2					
Totalt:					

		Förstorad sköldkörtel	Förminskad sköldkörtel	Förstorade follikulära celler	Follikulär hyperplasi
ID, doserat djur – replikat 1					
ID, doserat djur – replikat 2					
Totalt:					

		Förstorad sköldkörtel	Förminskad sköldkörtel	Förstorade follikulära celler	Follikulär hyperplasi
ID, doserat djur – replikat 1					
ID, doserat djur – replikat 2					
Totalt:					

▼**M6**

Tabell 8

Ytterligare histopatologiska kriterier

Datum: Kemikalie: Patolog:

		Storleksökning, follikulär lumen	Storleksminskning, follikulär lumen
ID, kontrolldjur – replikat 1			
ID, kontrolldjur – replikat 2			
Totalt:			

		Storleksökning, follikulär lumen	Storleksminskning, follikulär lumen
ID, doserat – djur replikat 1			
ID, doserat – djur replikat 2			
Totalt:			

		Storleksökning, follikulär lumen	Storleksminskning, follikulär lumen
ID, doserat djur – replikat 1			
ID, doserat djur – replikat 2			
Totalt:			

		Storleksökning, follikulär lumen	Storleksminskning, follikulär lumen
ID, doserat djur – replikat 1			
ID, doserat djur – replikat 2			
Totalt:			

▼**M6**

Tabell 9

Förklarande beskrivningar för histopatologiska resultat

Datum:

Kemikalie:

Patolog:

		Förklarande beskrivning
ID, kontrolldjur – replikat 1		
ID, kontrolldjur – replikat 2		
ID, doserat djur – replikat 1		
ID, doserat djur – replikat 2		

▼**M6**

ID, doserat djur – replikat 1		
ID, doserat djur – replikat 2		

ID, doserat djur – replikat 1		
ID, doserat djur – replikat 2		

▼M6

Tabell 10

Mall för sammanfattande rapporteringstabell för dag × (7 eller 21) för testet på groddjursmetamorfos

		Kontroll				Dos 1					Dos 2					Dos 3				
Endpoint	Replikat	Medel	sd	cv	N	Medel	sd	cv	N	p-värde	Medel	sd	cv	N	p-värde	Medel	sd	cv	N	p-värde
Bakbens-längd (mm)	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	Medelvär-de:																			
Längd från nos till kloak (mm)	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	Medelvär-de:																			
Våtvikt (mg)	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	Medelvär-de:																			

▼M6

Tabell 11

Mall för sammanfattande rapporteringstabell för dag x (7 eller 21) för uppgifter om utvecklingsstadier för testet på groddjursmetamorfos

		Kontroll				Dos 1					Dos 2					Dos 3				
	Replikat	Median	Min.	Max	N	Median	Min.	Max	N	p-värde	Median	Min.	Max	N	p-värde	Median	Min.	Max	Median	p-värde
Utvecklings-stadium	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	Medelvär-de:																			

02008R0440 — SV — 18.05.2017 — 007.001 — 1856

▼M6

Tillägg 3

Alternativ analys av vikt och längd om mer än 20 % av grodynglen genomgår de senare utvecklingsstadierna vid en eller flera koncentrationer

Om ett ökat antal grodyngel utvecklas bortom stadium 60 (≥ 20 %) i en eller flera nominella koncentrationer bör en tvåfaktors ANOVA med en nästlad variansstruktur utföras för samtliga grodyngel för att bedöma tillväxteffekter som beror på kemiska behandlingar, samtidigt som man tar hänsyn till den effekt de senare utvecklingsstadierna har på tillväxten.

Detta förslag innebär att man använder alla data, men att man tar hänsyn till den effekt som de senare utvecklingsfaserna har. Detta kan göras med en tvåfaktors ANOVA med en nästlad variansstruktur. Ange LateStage = ”ja” för ett djur om dess utvecklingsstadium är 61 eller mer. I annat fall anges LateStage = ”nej”. Därefter kan en tvåfaktors ANOVA för koncentrationen och LateStage och deras interaktion utföras, med Rep(Conc) som slumpmässig faktor och Tadpole(Rep) en ytterligare slumpmässig effekt. Detta behandlar ”rep” som analysenhet och ger i stort sett samma resultat som en vägd analys av medelvärdena för rep*latestage, vägda mot antalet djur per medelvärde. Om erhållna data strider mot variansanalysens krav på normalitet eller varianshomogenitet kan en normaliserad rangordningsomvandling göras för att undanröja denna invändning.

Utöver de vanliga ANOVA F-testerna för effekterna av Conc, LateStage, och deras interaktioner kan F-testet för interaktion ”delas upp” i ytterligare två ANOVA F-tester, ett för de genomsnittliga responserna över alla koncentrationer för LateStage = ”Nej” och ett annat för de genomsnittliga responserna över alla koncentrationer för LateStage = ”ja”. Ytterligare jämförelser av testkärlens medelvärden mot kontrollen görs inom varje nivå av LateStage. Ett trendtest kan utföras med hjälp av lämpliga kontraster, eller enklare parvisa jämförelser kan göras om det finns bevis på icke-monoton dos-respons inom en nivå av variabeln LateStage. En Bonferroni-Holm-justering av p-värdena görs endast om motsvarande F-skärning inte är signifikant. Detta kan göras i SAS och förmodligen även i andra statistiska programvarupaket. Komplikationer kan uppstå när det inte finns några djur som har utvecklats till sena stadier i vissa koncentrationer, men dessa situationer kan hanteras på ett okomplicerat sätt.

▼**M6**

Tillägg 4

Definitioner

Kemikalie: ett ämne eller en blandning

Testkemikalie: varje ämne eller blandning som testas med denna testmetod.

▼M6

C.39 REPRODUKTIONSTEST FÖR HOPPSTJÄRTAR I JORD

INLEDNING

1. Denna testmetod motsvarar OECD:s testriktlinje (TG) 232 (2009). Testmetoden är avsedd för bestämning av kemikaliers effekter på reproduktionskapaciteten hos hoppstjärtar i jord. Metoden bygger på befintliga förfaranden (1) (2). Den partenogenetiska *Folsomia candida* och den sexuellt reproducerande *Folsomia fimetaria* är två av de mest tillgängliga arterna av hoppstjärtar (Collembola), och de är odlingsbara och kommersiellt tillgängliga. När särskilda livsmiljöer behöver utvärderas som inte täcks av de två arterna kan förfarandet utökas även till andra arter av hoppstjärtar om de uppfyller giltighetskriterierna för testet.

2. Jordlevande hoppstjärtar är ekologiskt relevanta arter för ekotoxikologisk testning. Hoppstjärtar är insekter med ett tunt exoskelett som är mycket genomsläppligt för luft och vatten, och de företräder leddjursarter med en annan exponeringsväg och en annan exponeringsfrekvens än daggmaskar (Lumbricidae) och småringmaskar (Enchytraeidae).

3. Populationstätheten för hoppstjärtar uppgår vanligen till 10^5 m^{-2} i skikt med jord och lövförna i många terrestra ekosystem (3) (4). Vuxna djur är vanligtvis 0,5–5 mm långa, och deras bidrag till den totala animaliska biomassan och respirationen i jord är låg, uppskattningsvis mellan 1 % och 5 % (5). Deras viktigaste roll kan därför vara som potentiella reglerare av processer genom mikrobivori och predation på mikrofauna. Hoppstjärtar är bytesdjur för ett stort antal endogeiska och epigeiska ryggradslösa djur, såsom kvalster, enkelfotingar, spindlar, jordlöpare och kortvingar. Hoppstjärtar bidrar till nedbrytningsprocesser i sura jordar, där de kan vara de viktigaste jordlevande ryggradslösa djuren jämte småringmaskar, eftersom daggmaskar och dubbelfotingar vanligtvis är frånvarande.

4. *F. fimetaria* har en världsomspännande utbredning och är vanlig i många jordtyper, alltifrån sandig till lerig jord och från mull till mår. Denna hoppstjärt saknar ögon och pigment. Den har påträffats i jordbruksmark i hela Europa (6). Den är allätare, och i dess föda ingår svamphyfer, bakterier, protozoer och detritus. När den betar interagerar den med infektioner av växtpatogena svampar (7) och kan påverka mykorrhiza, vilket är känt för *F. candida*. Liksom de flesta hoppstjärtar har den sexuell reproduktion som kräver ständig närvaro av hanar för befruktning av ägg.

5. *F. candida* är också utbredd över hela världen. Den inte är vanligt förekommande i de flesta naturliga jordar, men den förekommer ofta i mycket stort antal i humusrika områden. Denna hoppstjärt saknar ögon och pigment. Den har en välutvecklad furca (hoppgaffel) och ett aktivt löpande rörelsemönster, och den hoppar gärna om den störs. Den ekologiska rollen för *F. candida* liknar den roll som *F. fimetaria* innehar, men dess livsmiljöer är mer organiskt rika jordar. Den förökar sig genom partenogenes (jungfrufödsel). Förekomsten av hanar är mindre än en promille.

PRINCIP FÖR TESTMETODEN

6. Synkrona vuxna djur (adulter) (*F. fimetaria*) eller unga djur (juveniler) (*F. candida*) exponeras för en serie koncentrationer av testkemikalien som blandats ner i en modifierad syntetisk jord (8) med ett innehåll av organiskt material (eller en annan jordtyp) på 5 %. Testet kan delas upp i två etapper:

   — Ett preliminärt (range-finding) test, om tillräcklig information om toxicitet inte finns att tillgå, där dödlighet och reproduktion är de viktigaste

▼M6

endpoints som utvärderas efter två veckor för *F. fimetaria* och tre veckor för *F. candida*.

— Ett slutgiltigt reproduktionstest där det totala antalet juveniler som produceras av föräldradjuren samt föräldradjurens överlevnad bedöms. Detta definitiva test pågår i tre veckor för *F. fimetaria* eller fyra veckor för *F. candida*.

Testkemikaliens toxiska effekter på adulters dödlighet och reproduktionskapacitet uttrycks som LC_x och EC_x genom att man passar in data in en lämplig modell genom icke-linjär regression för att uppskatta den koncentration som skulle orsaka x % dödlighet eller minskning av reproduktionskapaciteten, eller alternativt som NOEC/LOEC-värdet (9).

INFORMATION OM TESTKEMIKALIEN

7. De fysikaliska egenskaperna, vattenlösligheten, log K_{ow}, fördelningskoefficienten jord/vatten och ångtrycket för testkemikalien ska helst vara kända. Det är önskvärt att ha ytterligare uppgifter om testkemikaliens omvandling, spridning och fördelning i jord, såsom fotolys- och hydrolyshastigheterna och den biotiska nedbrytningshastigheten. Kemisk identifiering av testkemikalien i enlighet med IUPAC-nomenklatur, CAS-nummer, parti, sats, strukturformel och renhet bör dokumenteras om dessa uppgifter finns tillgängliga.

8. Testmetoden kan användas för kemikalier som är lösliga eller olösliga i vatten. Testkemikaliens appliceringsmetod måste dock anpassas i enlighet med detta. Testmetoden kan inte användas för flyktiga kemikalier, dvs. kemikalier för vilka Henrys konstant eller fördelningskoefficienten luft/vatten är större än ett, eller kemikalier för vilka ångtrycket överstiger 0,0133 Pa vid 25 °C.

TESTETS GILTIGHET

9. Följande kriterier bör uppfyllas i de obehandlade kontrollerna för att testresultatet ska anses vara giltigt:

— Den genomsnittliga dödligheten hos adulter bör inte överskrida 20 % vid testets slut.

— Det genomsnittliga antalet juveniler per kärl ska vara minst 100 vid testets slut.

— Variationskoefficienten som beräknas för antalet juveniler bör vara mindre än 30 % vid slutet av det definitiva testet.

REFERENSKEMIKALIEN

10. En referenskemikalie ska testas vid sin EC_{50}-koncentration för den valda testjorden antingen vid regelbundna intervaller eller eventuellt som ett inslag i varje testomgång för att kontrollera att testorganismernas respons i testsystemet ligger inom normala gränser. En lämplig referenskemikalie är borsyra, vilket bör minska reproduktionen med 50 % (10) (11) vid ca 100 mg/kg torrvikt jord för båda arterna.

BESKRIVNING AV TESTET

Testkärl och annan utrustning

11. Behållare som rymmer 30 g fuktig jord lämpar sig som testkärl. Testkärlen bör antingen vara av glas eller inert plast (giftfri). Man bör dock undvika att använda plastbehållare om exponeringen för testkemikalien minskas på grund av sorption. Testkärlen bör ha en tvärsnittsarea som gör det möjligt

▼M6

för jordens faktiska djup i testkärlet att vara 2–4 cm. Kärlen bör ha lock (t.ex. glas eller polyeten) som utformats för att minska vattenavdunstningen samtidigt som de tillåter gasutbyte mellan jorden och den omgivande luften. Behållaren ska vara åtminstone delvis genomskinlig för att möjliggöra ljusgenomsläpplighet.

12. Dessutom behövs normal laboratorieutrustning, särskilt följande:

— torkskåp,

— stereomikroskop,

— pH-mätare och luxmätare,

— en lämplig exakt våg,

— lämplig utrustning för temperaturreglering,

— lämplig utrustning för reglering av luftfuktigheten (inte nödvändigt om exponeringskärlen har lock),

— temperaturreglerad inkubator eller ett temperaturreglerat litet rum,

— pincett eller en luftflödesanordning med låg sugkraft.

Förberedelse av testjorden

13. En modifierad syntetisk jord (8) med en halt av organiskt material på 5 % ska användas. Alternativt kan naturlig jord användas, eftersom den syntetiska jorden inte är lik naturliga jordtyper. Den rekommenderade sammansättningen av den syntetiska jorden är följande (baserat på torrvikt, torkad till en konstant vikt vid 105 °C):

— 5 % vitmosstorv (*Sphagnum*), lufttorkad och finfördelad (en partikelstorlek på 2 ± 1 mm kan godtas),

— 20 % kaolinlera (kaolinithalt helst över 30 %),

— ca 74 % lufttorkad sand av industrikvalitet (beroende på den mängd $CaCO_3$ som behövs), övervägande fin sand där mer än 50 % av partiklarna har en storlek mellan 50 och 200 μm. Den exakta mängden sand beror på mängden $CaCO_3$ (se nedan). De bör tillsammans uppgå till 75 %.

— 1,0 % kalciumkarbonat ($CaCO_3$, i pulverform, analyskvalitet) tillsatt för att få ett pH-värde på 6,0 ± 0,5. Mängden kalciumkarbonat som ska tillsättas beror främst på torvens kvalitet/beskaffenhet (se anmärkning 1),

Anmärkning 1: Mängden $CaCO_3$ som behövs beror på jordsubstratets beståndsdelar och bör bestämmas genom mätning av pH-värdet i förinkuberade fuktiga delprover av jord omedelbart före testet.

Anmärkning 2: Det rekommenderas att man mäter pH-värdet och eventuellt C/N-kvoten, katjonutbyteskapaciteten (CEC) och halten av organiskt material i jorden i syfte att möjliggöra en normalisering i ett senare skede och att bättre kunna tolka resultaten.

Anmärkning 3: Om så krävs, t.ex. för särskilda teständamål, kan även naturliga jordar från oförorenade platser användas som test- och/eller odlingssubstrat. Om naturjord används bör man minst ange dess ursprung (insamlingsplats), pH, textur (partikelstorleksfördelning), CEC och innehåll av organiskt material, och jorden bör vara fri från alla föroreningar. För naturjord bör man kunna visa att den är lämpad för testet och att den uppfyller kriterierna för testresultatets giltighet innan den används i ett definitivt test.

▼M6

14. Jordens torra beståndsdelar blandas omsorgsfullt (t.ex. i en storskalig laboratorieblandare). Den maximala vattenhållningskapaciteten (WHC) för den syntetiska jorden bestäms i enlighet med de förfaranden som beskrivs i tillägg 5. Vattenhalten i testjorden bör optimeras så att en lös porös struktur uppnås som gör det möjligt för hoppstjärtarna att ta sig in i porerna. Detta är vanligtvis mellan 40–60 % av maximal vattenhållningskapacitet (WHC).

15. Två till sju dagar innan testet inleds förhandsfuktas den torra syntetiska jorden med tillräcklig mängd avjonat vatten så att den får en vattenhalt som motsvarar cirka hälften av den slutliga vattenhalten, i syfte att nå surhetsjämvikt. För bestämning av pH använder man en blandning av jord och 1 M kaliumklorid (KCl) eller 0,01 M kalciumklorid ($CaCl_2$) i förhållandet 1:5 (enligt tillägg 6). Om marken är surare än det intervall som krävs kan detta justeras genom tillsats av en lämplig mängd $CaCO_3$. Om jorden är för alkalisk kan detta justeras genom tillägg av en oorganisk syra som är ofarlig för hoppstjärtar.

16. Den förhandsfuktade jorden delas upp i portioner som motsvarar antalet testkoncentrationer (och referenskemikalie i förekommande fall) och kontroller som används i testet. Testkemikalierna tillförs och vattenhalten regleras enligt punkt 24.

Urval och förberedelse av försöksdjuren

17. Den partenogenetiska *F. candida* är den rekommenderade arten, eftersom denna art i ringtestet (11) av testmetoden uppfyllde validitetskriterierna för överlevnad oftare än *F. fimetaria*. Om någon annan art används bör den uppfylla giltighetskriterierna som beskrivs i punkt 9. Vid testets början bör djuren ha utfodrats väl och deras ålder bör vara mellan 23–26 dagar för *F. fimetaria* och 9–12 dagar för *F. candida*. För varje replikat bör antalet *F. fimetaria* vara tio hanar och tio honor, och för *F. candida* bör tio honor användas (se tillägg 2 och tillägg 3). De synkrona djuren väljs slumpvis ut från skålarna och deras hälsa och fysiska tillstånd kontrolleras för varje parti som läggs till ett replikat. Varje grupp med 10/20 individer läggs i en slumpmässigt utvald testbehållare. Stora honor av *F. fimetaria* väljs ut för att se till att man korrekt kan skilja dem från hanarna av *F. fimetaria*.

Beredning av testkoncentrationer

18. Fyra metoder för applicering av testkemikalien kan användas: 1) nedblandning av testkemikalien i jorden med vatten som bärämne, 2) nedblandning av testkemikalien i jorden med ett organiskt lösningsmedel som bärämne, 3) nedblandning av testkemikalien i jorden med sand som bärämne, eller 4) applicering av testkemikalien på jordytan. Valet av lämplig metod beror på kemikaliens egenskaper och syftet med testet. I allmänhet rekommenderas att man blandar ner testkemikalien i jorden. Emellertid kan man behöva använda appliceringsmetoder som är förenliga med testkemikaliens praktiska användning (t.ex. besprutning med en flytande beredning eller användning av särskilda beredningar av bekämpningsmedel såsom granulat eller betningsmedel). Jorden behandlas före hoppstjärtarna tillsätts, utom när testkemikalien tillsätts på jordytan, då hoppstjärtarna bör tillåtas att först komma ner i jorden.

Testkemikalier som är lösliga i vatten

19. En lösning av testkemikalien bereds i avjonat vatten, i tillräcklig mängd för att det ska räcka till alla replikat av en testkoncentration. Varje lösning av testkemikalien blandas grundligt med ett parti förhandsfuktad jord innan den tillsätts i testkärlet.

Testkemikalier som är olösliga i vatten

20. För kemikalier som inte är lösliga i vatten men som är lösliga i organiska lösningsmedel kan testkemikalien lösas upp i minsta möjliga volym lämpligt

▼M6

lösningsmedel (t.ex. aceton). Man ser alltjämt till att kemikalien blandas ordentligt med jorden och att den blandas med den del kvartssand som krävs. Endast flyktiga lösningsmedel bör användas. Om ett organiskt lösningsmedel används ska alla testkoncentrationer och en negativ lösningsmedelskontroll innehålla samma minimimängd av lösningsmedlet. Appliceringsbehållarna bör få stå utan lock under en viss tid så att lösningsmedlet som använts i samband med appliceringen av testkemikalien kan avdunsta, och då bör man se till att den toxiska kemikalien inte skingras under denna tid.

Testkemikalier som är svårlösliga i vatten och i organiska lösningsmedel

21. För kemikalier med dålig löslighet i vatten och i organiska lösningsmedel blandas kvartssand, som bör vara en del av den totala mängden sand som tillförs jorden, med mängden testkemikalie för att få önskad testkoncentration. Blandningen av kvartssand och testkemikalie tillförs den förhandsfuktade jorden och blandas omsorgsfullt efter tillsats av en lämplig mängd avjonat vatten för att få önskad fukthalt. Den slutliga blandningen fördelas mellan testkärlen. Förfarandet upprepas för varje testkoncentration, och en lämplig kontroll upprättas också.

Applicering av testkemikalien på jordytan

22. När testkemikalien är ett bekämpningsmedel kan det vara lämpligt att applicera den på jordytan genom besprutning. Jorden behandlas efter det att hoppstjärtarna har tillsatts. Testbehållarna fylls först med det fuktade jordsubstratet, därefter tillförs djuren, och sedan vägs testbehållarna. För att undvika att djuren direktexponeras för testkemikalien genom direktkontakt appliceras testkemikalien minst en halvtimme efter införandet av hoppstjärtarna. Testkemikalien bör appliceras så jämnt som möjligt på jordytan med hjälp av en lämplig besprutningsanordning i laboratoriestorlek för att simulera besprutning på fältet. Appliceringen bör ske vid en temperatur som varierar med ± 2 °C, och för vattenlösningar, emulsioner eller dispersioner med en vattenappliceringshastighet som motsvarar riskbedömningens rekommendationer. Hastigheten bör kontrolleras med hjälp av lämplig kalibreringsteknik. Särskilda beredningar som granulat eller betningsmedel kan appliceras på ett sätt som är förenligt med lantbrukspraxis. Foder tillsätts efter besprutningen.

FÖRFARANDE

Testbetingelser

23. Testets medeltemperatur bör vara 20 ± 1 °C med ett temperaturintervall på 20 ± 2 °C. Testet utförs under kontrollerade ljus/mörker-cykler (helst 12 timmar ljus och 12 timmar mörker) med belysning på 400–800 lux i området där testkärlen förvaras.

24. För att kontrollera jordens fuktighet vägs kärlen i början, mitten och slutet av testet. Viktförlust > 2 % ska kompenseras genom tillsättning av avjonat vatten. Det bör noteras att förlusten av vatten kan minskas genom att man bibehåller en hög luftfuktighet (> 80 %) i testinkubatorn.

25. pH-värdet bör mätas i början och slutet av både det preliminära (rangefinding) och det definitiva testet. Mätningarna bör göras i ett extra kontrollprov och ett extra prov från de behandlade jordproverna (alla koncentrationer) som beretts och underhållits på samma sätt som testkulturerna men utan tillsats av hoppstjärtar.

Testförfarande och mätningar

26. För varje testkoncentration placeras en mängd testjord som motsvarar 30 g färskvikt i testkärlet. Vattenkontroller utan testkemikalie upprättas också. Om

▼M6

en vehikel används för applicering av testkemikalien bör man utöver testserierna även ha en kontrollserie som innehåller endast vehikeln. Lösningsmedlet eller dispergeringsmedlet bör ha samma koncentration som den som används i testkärlen med testkemikalien.

27. De enskilda hoppstjärtarna överförs försiktigt till varje testkärl (fördelas slumpmässigt i testkärlen) och placeras på jordytan. För att förflytta djuren effektivt kan en luftflödesanordning med låg sugkraft användas. Antalet replikat för testkoncentrationer samt för kontroller beror på testutformningen. Testkärlen placeras slumpvis i inkubatorn och deras positioner omfördelas slumpvis varje vecka.

28. För testet med *F. fimetaria* används tjugo adulter per testkärl, tio hanar och tio honor, 23–26 dagar gamla. På dag 21 insamlas hoppstjärtarna från jorden och räknas. För *F. fimetaria* använder man storleken för att skilja könen åt i det synkroniserade partiet djur som används i testet. Honorna är klart större än hanarna (se tillägg 3).

29. För testet med *F. candida* används tio 9–12 dagar gamla juveniler per testkärl. På dag 28 insamlas hoppstjärtarna från jorden och räknas.

30. Som en lämplig foderkälla tillsätts en tillräcklig mängd, t.ex. 2–10 mg, torkad granulerad bagerijäst, som finns kommersiellt tillgänglig för hushållsbruk, i varje behållare vid testets inledning och efter ca två veckor.

31. Vid slutet av testet bedöms dödligheten och reproduktionen. Efter tre veckor (*F. fimetaria*) eller fyra veckor (*F. candida*) insamlas hoppstjärtarna från testjorden (se tillägg 4) och räknas (12). En hoppstjärt registreras som död om den inte är närvarande i det insamlade provet. Extraktions- och räknemetoden bör valideras. Valideringen inbegriper en extraktionseffektivitet för juveniler som överstiger 95 %, och utförs t.ex. genom att ett känt antal tillsätts i jorden.

32. En praktisk sammanfattning och tidsplan för testförfarandet beskrivs i tillägg 2.

Testets utformning

Preliminärt (range-finding) test

33. Vid behov utförs ett preliminärt test med t.ex. fem koncentrationer av testkemikalien på 0,1, 1,0, 10, 100 och 1 000 mg/kg torrvikt jord och två replikat för varje testkärl och kontroll. Ytterligare information, från tester med likartade kemikalier eller från litteraturen, om hoppstjärtarnas dödlighet eller fortplantning kan också vara användbar för att avgöra vilka koncentrationsintervall som ska användas i det preliminära testet.

34. Det preliminära testets varaktighet är två veckor för *F. fimetaria* och tre veckor för *F. candida* för att garantera att en kull med juveniler har producerats. Vid slutet av testet bedöms hoppstjärtarnas dödlighet och reproduktion. Antalet adulter och förekomsten av juveniler bör registreras.

Definitivt test

35. För bestämning av EC_x (t.ex. EC_{10}, EC_{50}) bör tolv koncentrationer testas. Det rekommenderas att man har minst två replikat för varje testkoncentrationsbehandling och sex kontrollreplikat. Avståndsfaktorn kan variera beroende på dos-responsmönstret.

▼M6

36. För bestämning av NOEC/LOEC bör minst fem koncentrationer i en geometrisk serie testas. Fyra replikat för varje testkoncentrationsbehandling plus åtta kontroller rekommenderas. Koncentrationerna bör skilja sig åt med en faktor på högst 1,8.

37. Ett kombinerat tillvägagångssätt gör det möjligt att bestämma både NOEC/LOEC och ECx. I denna kombinerade strategi bör man använda åtta behandlingskoncentrationer i en geometrisk serie. Det rekommenderas att man har fyra replikat per testkärl plus åtta kontroller. Koncentrationerna bör skilja sig åt med en faktor på högst 1,8.

38. Om inga effekter observeras vid den högsta koncentrationen i det preliminära testet (dvs. 1 000 mg/kg), kan reproduktionstestet utföras som ett toleranstest med en testkoncentration på 1 000 mg/kg och en kontroll. Ett toleranstest gör det möjligt att visa att det inte förekommer någon statistiskt signifikant effekt vid gränskoncentrationen. Åtta replikat bör användas både för den behandlade jorden och för kontrollen.

DATA OCH RAPPORTERING

Behandling av resultaten

39. Reproduktionskapaciteten är den viktigaste endpointen (dvs. antalet juveniler som produceras per testkärl). I den statistiska analysen, t.ex. ANOVA-förfaranden, jämförs testkärlen med hjälp av Students t-test eller Williams test. 95-procentiga konfidensintervaller beräknas för medelvärden för enskilda testkärl.

40. Antalet överlevande adulter i de obehandlade kontrollerna är ett viktigt giltighetskriterium och bör dokumenteras. Liksom i det preliminära testet bör alla andra skadliga tecken rapporteras i den slutliga rapporten.

LC_x och EC_x

41. EC_x-värden, inklusive deras sammanhörande lägre och övre 95-procentiga konfidensgränser för parametern i fråga, beräknas med hjälp av lämpliga statistiska metoder (t.ex. logistiska funktioner eller Weibull-funktioner, den modifierade Spearman-Kärbermetoden eller enkel interpolering). EC_x-värdet beräknas genom att man inför ett värde som motsvarar x % av medelvärdet för kontrollen i den ekvation som erhållits. För att beräkna EC_{50} eller något annat EC_x-värde bör en regressionsanalys utföras på hela uppsättningen data. LC_{50} beräknas vanligen med hjälp av probitanalys eller liknande analys som beaktar binomialfördelade dödlighetsdata.

NOEC/LOEC

42. Om en statistisk analys används för att bestämma NOEC/LOEC är det nödvändigt att sammanställa statistiska uppgifter för varje enskilt kärl (enskilda kärl anses utgöra replikat). Lämpliga statistiska metoder bör användas i enlighet med OECD:s dokument 54, *Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application* (9). I allmänhet ska negativa effekter av testkemikalien jämfört med kontrollen undersökas genom en ensidig hypotesprövning vid $p \leq 0,05$.

43. Normalfördelning och varianshomogenitet kan testas med hjälp av ett lämpligt statistiskt test, t.ex. Shapiro-Wilks test respektive Levenes test ($p \leq 0,05$). Ensidig variansanalys (ANOVA) och därpå följande flerjämförelsetester kan

▼M6

utföras. Multipla jämförelser (t.ex. Dunnetts test) eller step-down-grundade trendtester (t.ex. Williams test) kan användas för att beräkna huruvida det finns betydande skillnader ($p \leq 0,05$) mellan kontrollerna och de olika testkemikaliekoncentrationerna (välj rekommenderat test i enlighet med OECD:s dokument 54 (9)). I annat fall kan icke-parametriska metoder (t.ex. Bonferronis U-test enligt Holm eller Jonckheere-Terpstras trendtest) användas för att bestämma NOEC och LOEC.

Toleranstest

44. Om ett toleranstest (jämförelse av endast ett testkärl och kontrollen) har utförts och de nödvändiga förutsättningarna för parametriska testförfaranden (normalitet, homogenitet) är uppfyllda, kan metriska responser utvärderas med hjälp av Students test (t-test). Om dessa krav inte uppfylls kan man använda t-testet med olika varians (Welchs t-test) eller ett icke-parametriskt test, såsom Mann-Whitneys U-test.

45. För att se om det finns betydande skillnader mellan kontrollerna (kontroll och kontroll med lösningsmedel), kan replikaten för varje kontroll testas enligt beskrivningen för toleranstestet. Om man inte upptäcker betydande skillnader med dessa tester kan alla kontroll- och lösningsmedelskontrollreplikat sammanföras. I annat fall bör alla testkärl jämföras med lösningsmedelskontrollen.

Testrapport

46. Testrapporten ska innehålla åtminstone följande information:

Testkemikalie

— testkemikaliens identitet, sändnings- och partinummer, CAS-nummer, renhet,

— testkemikaliens fysikalisk-kemiska egenskaper (t.ex. log Kow, vattenlöslighet, ångtryck, Henrys konstant (H) och helst information om testkemikaliens omvandling, spridning och fördelning i jorden), om dessa uppgifter finns tillgängliga,

— testkemikaliens och tillsatsernas beredning bör specificeras om inte den rena kemikalien testas.

Testorganismer

— testorganismernas art och leverantör, beskrivning av odlingsbetingelserna och testorganismernas åldersintervall.

Testbetingelser

— beskrivning av testets utformning och testförfarandet,

— detaljer om testjordens beredning, detaljerade specifikationer om naturjord används (ursprung, historia, partiklarnas storleksfördelning, pH-värde, halt av organiskt material),

— jordens vattenhållningskapacitet,

— en beskrivning av den teknik som används för att applicera testkemikalien på jorden,

— testbetingelser: ljusintensitet, ljus/mörker-cyklernas varaktighet, temperatur,

— en beskrivning av utfodringsprogrammet, typen och mängden av det foder som används i testet, datum för utfodringen,

— pH-värdet och vattenhalten i jorden vid testets början och slut (kontroll och varje behandling),

— detaljerad beskrivning av extraktionsmetoden och extraktionseffektiviteten.

▼**M6**

Testresultat

— antalet juveniler som fastställts i varje provkärl vid testets slut,

— antalet adulter och deras dödlighet (%) i alla provkärl vid testets slut,

— en beskrivning av uppenbara eller fysiologiska eller patologiska symtom eller tydliga beteendeförändringar,

— de resultat som erhållits med referenstestkemikalien,

— NOEC/LOEC-värdena, LC_x för dödlighet och EC_x för reproduktion (främst LC_{50}, LC_{10} och EC_{50} och EC_{10}) samt de 95-procentiga konfidensintervallen. En kurva med den anpassade modell som har använts för beräkningen, dess funktionsekvation och dess parametrar (se (9)),

— alla upplysningar och observationer som kan vara till nytta vid tolkningen av resultaten,

— det faktiska testets giltighet om hypotestestning utförs (9),

— avvikelser från de förfaranden som beskrivs i denna testmetod och ovanliga händelser under testets gång,

— testets giltighet,

— den lägsta påvisbara skillnaden när NOEC beräknas.

LITTERATUR

(1) Wiles, J. A. och Krogh, P. H. (1998) Testing with the collembolans *I. viridis*, *F. candida* and *F. fimetaria*. I Handbook of soil invertebrate toxicity tests (red. H. Løkke och C. A. M. Van Gestel), s. 131–156. John Wiley & Sons, Ltd., Chichester

(2) ISO (1999) Markundersökningar – Reproduktionshämning av Collembola (*Folsomia candida*) på grund av markföroreningar. Nr 11267. Internationella standardiseringsorganisationen, Genève

(3) Burges, A. och Raw, F. (red.) (1967) Soil Biology. Academic Press. London

(4) Petersen, H. och Luxton, M. (1982) A comparative analysis of soil fauna populations and their role in decomposition processes. Oikos 39: 287–388

(5) Petersen, H. (1994) A review of collembolan ecology in ecosystem context. Acta Zoologica Fennica 195: 111–118

(6) Hopkin, S. P. (1997). *Biology of the Springtails (Insecta: Collembola)*. Oxford University Press. 330 s. (ISBN 0-19-854084-1)

(7) Ulber, B. (1983) Einfluss von *Onychirurus fimatus* Gisin (Collembola, Onychiuridae) und *Folsomia fimetaria* L. (Collembola, Isotomidae) auf *Pythium ultimum* Trow. einen Erreger des Wurzelbrandes der Zuckerrübe. I New Trends in Soil Biology (Lebrun, Ph., André, H. M., De Medts, A., Grégoire-Wibo, Wauthy, G. (red.). Proceedings of the VI. international colloquium on soil zoology, Louvain-la-neuve (Belgium), 30 August–2 September 1982, Dieu-Brichart, Ottignies-Louvain-la-Neuve, s. 261–268

(8) Kapitel C.36 i denna bilaga, Reproduktionstest i jord för rovkvalster (*Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer).*

(9) OECD (2006), Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application. OECD series on testing and assessment, nr 54, ENV/JM/MONO(2006)18, OECD Paris

(10) Scott-Fordsmand, J. J. och Krogh, P. H. (2005) Background report on prevalidation of an OECD springtail test guideline. Miljöprojekt nr 986. Miljøstyrelsen. 61 s. Danska miljöministeriet.

▼**M6**

(11) Krogh, P. H. (2009). Toxicity testing with the collembolans *Folsomia fimetaria* and *Folsomia candida* and the results of a ringtest. Danska miljöstyrelsen, miljöprojekt nr 1256, 66 s.

(12) Krogh, P. H., Johansen, K. och Holmstrup, M. (1998) Automatic counting of collembolans for laboratory experiments. Appl. Soil Ecol. 7, 201–205

(13) Fjellberg, A. (1980) Identification keys to Norwegian Collembola. Norsk Entomologisk Forening.

(14) Edwards, C. A. (1955) Simple techniques for rearing Collembola, Symphyla and other small soil inhabiting arthropods. I Soil Zoology (Kevan, D. K. McE., red.). Butterworths, London, s. 412–416

(15) Goto, H. E. (1960) Simple techniques for the rearing of Collembola and a note on the use of a fungistatic substance in the cultures. Entomologists' Monthly Magazine 96:138–140.

▼M6

Tillägg 1

Definitioner

Följande definitioner gäller för denna testmetod (i detta test uttrycks alla effektkoncentrationer som massan av testkemikalien per torrmassa av testjorden):

Kemikalie: ett ämne eller en blandning.

Nolleffektkoncentrationen (NOEC): den högsta koncentrationen av testkemikalien vid vilken ingen effekt har noterats. I detta test har en halt som motsvarar NOEC ingen statistiskt signifikant effekt ($p < 0,05$) inom en given exponeringstid jämfört med ett kontrollprov.

Lägsta koncentration med observerad effekt (LOEC): den lägsta koncentrationen av testkemikalien som jämfört med ett kontrollprov har en statistiskt signifikant effekt ($p < 0,05$) inom en given exponeringstid.

ECx (koncentration som orsakar x % effekt): den koncentration som orsakar en x-procentig effekt på testorganismerna inom en given exponeringstid jämfört med ett kontrollprov. EC_{50} är till exempel den koncentration som beräknas ha en effekt på en av testets endpoints i 50 % av en exponerad population under en fastställd exponeringstid.

Testkemikalie: varje ämne eller blandning som testas med denna testmetod.

▼M6

Tillägg 2

De viktigaste åtgärderna och tidsplan för att utföra ett test på hoppstjärtar

Stegen i testet kan sammanfattas på följande sätt:

Tid (dag)	Åtgärd
– 23 till – 26	Förberedelse av synkron kultur med *F. fimetaria*
– 14	Bered syntetisk jord (blandning av torra beståndsdelar). Kontrollera den syntetiska jordens pH och justera efter behov. Mät jordens maximala vattenhållningskapacitet.
– 9 till – 12	Förberedelse av synkron kultur med *F. candida.*
– 2 till – 7	Förhandsfukta jorden.
– 1	Fördela juveniler i partier. Bered stamlösningar och tillsätt testkemikalie om lösningsmedel krävs.
0	Bered stamlösningar och tillsätt testkemikalie om den är fast, vattenlöslig eller om ytapplicering krävs. Mät jordens pH och väg behållarna. Tillsätt föda. Introducera hoppstjärtar.
14	Preliminärt test med *F. fimetaria*: Avsluta testet, ta ut djuren, mät jordens pH och vattenförlust (vikt). Definitiva test: Mät fukthalten, fyll på vatten och tillsätt 2–10 mg jäst.
21	Definitivt test med *F. fimetaria*: Avsluta testet, ta ut djuren, mät jordens pH och vattenförlust (vikt). Preliminärt test med *F. candida*: Avsluta testet, ta ut djuren, mät jordens pH och vattenförlust (vikt).
28	Definitivt test med *F. candida*: Avsluta testet, ta ut djuren, mät jordens pH och vattenförlust (vikt).

▼M6

Tillägg 3

Vägledning om odling och synkronisering av *F. fimetaria* och *F. candida*

De tidpunkter och den varaktighet som anges i denna vägledning bör kontrolleras för varje särskild hoppstjärtsart för att se till att tidsplanen möjliggör tillräckligt synkroniserade juveniler. I princip bestämmer äggläggningen efter att adulterna överförts till färskt substrat samt äggkläckningen den lämpliga dagen för insamling av ägg och insamling av synkrona juveniler.

Det rekommenderas att man har en permanent stamodling med t.ex. 50 kärl/petriskålar. Stamodlingen ska hållas i gott skick genom att man utfodrar den varje vecka, vattnar den och avlägsnar gammalt foder och döda djur. Alltför få hoppstjärtar på substratet kan leda till hämning på grund av hög svamptillväxt. Om stamodlingen används alltför ofta för äggproduktion kan odlingen drabbas av utmattning. Tecken på utmattning är döda adulter och mögel på substratet. De återstående äggen från produktionen av synkrona djur kan användas för att vitalisera odlingen.

I en synkron kultur med *F. fimetaria* kan hanar särskiljas från honor främst genom storleken. Hanarna är betydligt mindre än honorna och hanarnas gånghastighet är snabbare än honornas. Ett korrekt val av kön kräver inte särskilt mycket träning och kan bekräftas genom en mikroskopisk undersökning av djurens genitalier (13).

1. **Uppfödning**

1.a. *Beredning av odlingssubstrat*

Odlingssubstratet är gips (kalciumsulfat) med aktivt träkol. Detta ger ett fuktigt substrat. Kolets uppgift är att absorbera spillgaser och exkret (14) (15). Olika former av träkol kan användas för att underlätta observationer av hoppstjärtarna. Pulvriserat träkol används till exempel för *F. candida* och *F. fimetaria* (vilket ger ett svart eller grått gips).

Substratets beståndsdelar:

— 20 ml aktivt träkol

— 200 ml destillerat vatten

— 200 ml gips

eller

— 50 g aktivt pulvriserat träkol

— 260–300 ml destillerat vatten

— 400 g gips.

Substratblandningen får stelna innan användning.

1.b. *Avel*

Hoppstjärtarna förvaras i behållare såsom petriskålar (90 mm × 13 mm) med botten täckt av ett 0,5 cm tjockt skikt av gips/kolsubstrat. De odlas vid 20 ± 1 °C med en ljus/mörkercykel på 12:12 timmar (400–800 lux). Behållarna hålls alltid fuktiga, och man måste se till att den relativa luftfuktigheten i behållarna är 100 %. Detta kan säkerställas genom förekomsten av

▼M6

fritt vatten i det porösa gipset, men man ska undvika att ett vattenskikt bildas på gipsytan. Vattenförluster kan förhindras genom att man tillhandahåller en fuktig omgivande luft. Alla döda individer bör avlägsnas från behållarna, liksom allt mögligt foder. För att stimulera äggproduktionen är det nödvändigt att överföra adulterna till petriskålar med nyberett gips/kolsubstrat.

1.c. *Foderkälla*

Torkad granulerad bagerijäst används som enda foderkälla för både *F. candida* och *F. fimetaria*. Färskt foder ges en eller två gånger i veckan, för att undvika att fodret angrips av mögel. Det placeras direkt på gipset i en liten hög. Mängden bagerijäst bör anpassas efter storleken på hoppstjärtpopulationen, men i regel räcker det med 2–15 mg.

2. **Synkronisering**

Testet bör utföras med synkroniserade djur så att man får enhetliga försöksdjur som befinner sig i samma stadium och har samma storlek. Dessutom gör synkroniseringen av *F. fimetaria* att man kan särskilja hanar och honor från och med tre veckors ålder på grund av sexuell dimorfism, dvs. skillnader i storleken. Det förfarande som beskrivs nedan är ett förslag till hur man kan få fram synkroniserade djur (de praktiska stegen är valfria).

2.a. *Synkronisering.*

— Förbered behållare med ett 0,5 cm tjockt skikt med gips/kolsubstrat.

— För över för äggläggningsändamål 150–200 adulta *F. fimetaria* och 50–100 *F. candida* från de 15–20 bästa stamodlingsbehållarna med 4–8 veckor gammalt substrat till de nya behållarna och utfodra med 15 mg bagerijäst. Undvik att få med juveniler tillsammans med adulter eftersom närvaron av juveniler kan hämma äggproduktionen.

— Förvara odlingen i 20 ± 1 °C (medelvärdet ska vara 20 °C) med en ljus/mörker-cykel på 12/12 timmar (400–800 lux). Se till att det finns tillgång till färskt foder och att luften är vattenmättad. Foderbrist kan göra att djuren lämnar sin avföring på äggen, vilket leder till svampangrepp på äggen, och *F. candida* kan kannibalisera på sina egna ägg. Samla efter tio dagar försiktigt in äggen med en nål och en spatel och flytta över dem på ”äggpapper” (små bitar filterpapper som doppats i gips/kolblandning) som placeras i en behållare med färskt gips/kolsubstrat. Ett fåtal jästkorn tillsätts till substratet för att locka till sig juvenilerna och få dem att lämna äggpappret. Det är viktigt att äggpappret och substratet är fuktiga, annars kommer äggen att torka ut. Som ett alternativ kan adulterna avlägsnas från de synkroniserade odlingslådorna efter att de har lagt ägg i två eller tre dagar.

— Efter tre dagar har de flesta äggen på äggpappret kläckts, och en del juveniler kan finnas under äggpappret.

— För att få juveniler av samma ålder avlägsnar man äggpappret med ägg som fortfarande inte har kläckts från petriskålen med en pincett. Juvenilerna, som nu är 0–3 dagar gamla, blir kvar i skålen och utfodras med bagerijäst. Okläckta ägg kastas bort.

— Ägg och kläckta juveniler odlas på samma sätt som adulter. I synnerhet när det gäller *F. fimetaria* bör följande åtgärder vidtas: se till att det finns tillräckligt med färskt foder, avlägsna gammalt mögligt foder, fördela efter en vecka juvenilerna i nya petriskålar om densiteten är högre än 200.

▼M6

2.b. *Hanteringen av hoppstjärtar vid testets inledning*

— Samla in de 9–12 dagar gamla *F. candida* eller de 23–26 dagar gamla *F. fimetaria*, t.ex. genom uppsugning, och överför dem till en liten behållare med fuktigt gips/kolsubstrat. Deras fysiska tillstånd kontrolleras under ett binokulärt mikroskop (skadade djur kastas bort). Alla åtgärder bör vidtas samtidigt som hoppstjärtarna hålls i en fuktig atmosfär för att undvika stress på grund av torka, t.ex. genom att man använder fuktade ytor osv.

— Vänd behållaren upp och ner och knacka på den för att överföra hoppstjärtarna till jorden. Statisk elektricitet bör neutraliseras, annars kan djuren komma att flyga ut i luften, eller fastna på testbehållarens sidor och torka ut. En joniserare eller en fuktig trasa under behållaren kan användas för neutralisering.

— Fodret bör fördelas över hela jordytan och inte bara i en enda klump.

— Under transporten och under testperioden bör man undvika att knacka på eller på annat sätt fysiskt rubba testbehållarna, eftersom detta kan öka jordens sammanpackning och försvåra interaktionen mellan hoppstjärtarna.

3. **Alternativa hoppstjärtarter**

Andra hoppstjärtarter kan väljas för testning enligt denna testmetod, t.ex. *Proisotoma minuta, Isotoma viridis, Isotoma anglicana, Orchesella cincta, Sinella curviseta, Paronychiurus kimi, Orthonychiurus folsomi, Mesaphorura macrochaeta*. Ett antal förutsättningar bör vara uppfyllda innan man använder alternativa arter:

— De bör vara otvetydigt identifierbara.

— Motivering för valet av art bör anges.

— Det bör säkerställas att reproduktionsbiologin ingår i testfasen så att den utgör ett potentiellt mål under exponeringen.

— Deras livshistoria bör vara känd: ålder vid könsmognad, äggutvecklingens varaktighet och stadier som utsätts för exponering.

— Optimala förutsättningar för tillväxt och reproduktion bör tillhandahållas genom testsubstratet och fodret.

— Variabiliteten bör vara tillräckligt låg för att en exakt och tillförlitlig uppskattning av toxiciteten ska kunna göras.

▼M6

Tillägg 4

Insamling och räkning av djur

1. **Två insamlingsmetoder kan användas.**

1.a. Första metoden: En extraktor med kontrollerad temperaturökning baserad på MacFadyens principer kan användas (1). Värmen kommer från ett värmeelement överst i extraktionslådan (som regleras med hjälp av en termistor som placeras på ytan av jordprovet). Temperaturen i den kylda vätskan som omger insamlingskärlet regleras med hjälp av en termistor som sitter på insamlingskärlets yta (som placeras under jordprovet). Termistorerna är kopplade till en programmerbar kontrollenhet som höjer temperaturen enligt en förprogrammerad tidsplan. Djuren samlas upp i den kylda insamlingslådan (2 °C) med ett bottenskikt av gips/kol. Extraktionen inleds vid 25 °C, temperaturen ökas automatiskt varje tolvtimmarsperiod med 5 °C, och extraktionen varar sammanlagt 48 timmar. Efter tolv timmar vid 40 °C avslutas extraktionen.

1.b. Andra metoden: Efter den experimentella inkubationstiden bedöms antalet juvenila hoppstjärtar med hjälp av flotation. För detta ändamål utförs testet i kärl med en volym på ca 250 ml. Vid testets slut tillsätts ca 200 ml destillerat vatten. Jorden rörs försiktigt om med en liten pensel så att hoppstjärtarna flyter upp till vattenytan. En liten mängd, ca 0,5 ml, svart Kentmeres fotografiska färgämne kan tillsättas vattnet för att underlätta räkningen genom att öka kontrasten mellan vattnet och de vita hoppstjärtarna. Färgämnet inte är giftigt för hoppstjärtar.

2. **Räkning:**

Räkning av antalet djur kan utföras med blotta ögat eller under ljusmikroskop med hjälp av ett rutnät som placeras över flotationskärlet eller genom att fotografera ytan i varje kärl och senare att räkna hoppstjärtarna på uppförstorade foton eller projicerade diabilder. Räkningarna kan även utföras med hjälp av digitala bildbehandlingstekniker (12). Alla tekniker bör valideras.

▼M6

Tillägg 5

Bestämning av jordens maximala vattenhållningskapacitet (WHC)

Följande metod för bestämning av den maximala vattenhållningskapaciteten (WHC) har konstaterats vara lämplig. Den beskrivs i bilaga C till ISO DIS 11268-2 (*Markundersökningar – Föroreningars effekt på daggmaskar (Eisenia fetida). Del 2: Bestämning av effekter på reproduktion*).

Samla in en fastställd kvantitet (t.ex. 5 g) testjordsubstrat med hjälp av en lämplig anordning (jordborr med rör osv.). Täck rörets botten med bit vått filterpapper och placera det sedan i en ställning i ett vattenbad. Röret bör gradvis nedsänkas i vattnet tills vattnet står över jordytan. Det bör därefter lämnas i vattnet i cirka tre timmar. Eftersom allt vatten som absorberas av jordens kapillärer inte kan hållas kvar bör jordprovet dräneras i två timmar genom att röret placeras på en bädd av mycket fuktig finmald kvartssand i ett slutet kärl (för att förhindra uttorkning). Provet bör sedan torkas till en konstant vikt vid 105 °C och vägas. Vattenhållningskapaciteten (WHC) ska beräknas enligt följande:

$$\text{WHC (i \% av torrvikten)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

där

S = vattenmättat substrat + rörets massa + filterpapprets massa

T = emballagevikt (rörets massa + filterpapprets massa)

D = substratets torrvikt

▼**M6**

Tillägg 6

Bestämning av jordens pH-värde

Följande metod för bestämning av pH-värdet i jord bygger på beskrivningen i ISO DIS 10390: *Markundersökningar – Bestämning av pH*.

En bestämd mängd jord torkas i rumstemperatur i minst 12 timmar. En suspension av jorden (som innehåller minst 5 gram jord) bereds därefter i fem gånger dess volym med antingen 1 M kaliumkloridlösning (KCl) av analyskvalitet eller 0,01 M kalciumkloridlösning ($CaCl_2$) av analyskvalitet. Suspensionen skakas därefter omsorgsfullt i fem minuter och får sedan stå och klarna i minst 2 timmar men högst 24 timmar. Vätskefasens pH mäts sedan med en pH-mätare som har kalibrerats före varje mätning med hjälp av ett antal lämpliga buffertlösningar (t.ex. pH 4,0 och 7,0).

▼M6

C.40 TOXICITETSTEST I SEDIMENT- OCH VATTENFAS PÅ CHIRONOMIDLARVER MED SPIKAT SEDIMENT ELLER SPIKAT VATTEN

INLEDNING

1. Denna testmetod motsvarar OECD:s testriktlinje (TG) 233 (2010). Den är utformad för att bedöma effekterna av livslång exponering för kemikalier på sötvattenslevande fjädermyggor *Chironomus* spp., och täcker helt den första generationen (P-generationen) och inledningen av den andra generationen (F1-generationen). Det är en utvidgning av de befintliga testmetoderna C.28 (1) och C.27 (15) med användning av ett exponeringsscenario med spikat vatten eller ett scenario med spikat sediment. Det tar hänsyn till befintliga toxicitetstestprotokoll för *Chironomus riparius* och *Chironomus dilutus* (tidigare benämnd *C. tentans* (2)) som har tagits fram i Europa och Förenta staterna (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) och därefter ringtestats (1) (7) (10) (11) (12). Även andra väldokumenterade chironomider kan användas, t.ex. *Chironomus yoshimatsui* (13) (14). Exponeringens totala varaktighet är ca 44 dagar för *C. riparius* och *C. yoshimatsui* och ca 100 dagar för *C. dilutus*.

2. Exponeringsscenarier för både vatten och sediment beskrivs i denna testmetod. Valet av lämpligt exponeringsscenario beror på den avsedda tillämpningen för testet. Vattenexponeringsscenariot, i vilket vattenkolumnen spikas, är avsett att simulera vindavdrift av bekämpningsmedel och täcker den inledande maximala koncentrationen i ytvattnet. Spikning av vatten kan även användas för andra typer av exponering (inklusive utsläpp av kemikalier), men inte för ackumuleringsprocesser i sedimentet som varar längre än testperioden. I ett sådant fall, och även när avrinning är bekämpningsmedlets huvudsakliga tillförselväg till vattenmassor, kan ett spikat sediment vara lämpligare. Om andra exponeringsscenarier är av intresse, kan man lätt anpassa utformningen av testet till detta. Om till exempel fördelningen av testkemikalien mellan vattenfas och sedimentlager inte är av intresse och adsorptionen till sedimentet måste minimeras kan man överväga att använda ett alternativt syntetiskt sediment (t.ex. kvartssand).

3. Kemikalier som behöver testas på sedimentlevande organismer kan finnas kvar i sedimentet under lång tid. Sedimentlevande organismer kan exponeras via ett antal vägar. Den relativa betydelsen av varje exponeringsväg och den tid det tar för var och en av dem att bidra till den totala toxiska effekten beror på kemikaliens fysikalisk-kemiska egenskaper. För starkt adsorberande kemikalier eller för kemikalier som binds kovalent till sedimentet kan förtäring av förorenat foder vara en viktig exponeringsväg. För att inte underskatta toxiciteten hos starkt lipofila kemikalier kan man överväga att tillsätta foder till sedimentet innan testkemikalien appliceras (se punkt 31). Det är därför möjligt att ta med alla exponeringsvägar och alla levnadsstadier.

4. De endpoints som mäts är det totala antalet kläckta vuxna exemplar (både för första och andra generationen), utvecklingshastigheten (både för första och andra generationen) könsfördelningen för fullständigt kläckta levande vuxna djur (både för första och andra generationen), antal äggband per honor (endast för första generationen) och äggbandens fertilitet (endast för första generationen).

5. Det rekommenderas starkt att använda syntetiskt sediment. Syntetiskt sediment har flera fördelar jämfört med naturliga sediment:

▼M6

— variationen mellan testen reduceras eftersom syntetiskt sediment bildar en reproducerbar ”standardmatris”, och behovet av att få fram oförorenade och rena sediment elimineras,

— testen kan inledas när som helst utan att beakta säsongvariationer i testsedimentet och det behövs ingen förbehandling av sedimentet för att få bort naturligt förekommande fauna,

— kostnaden är lägre jämfört med insamling på fältet av tillräckliga mängder sediment för rutintestning,

— syntetiskt sediment ger möjlighet till jämförelser av toxicitet mellan undersökningarna och till klassificering av kemikalierna i enlighet med detta (3).

6. De definitioner som används finns i tillägg 1.

PRINCIP FÖR TESTMETODEN

7. Första stadiets chironomidlarver exponeras för ett urval koncentrationer av testämnet i ett sediment/vattensystem. Testet inleds genom att man placerar första stadiets larver (första generationen) i testbägare som innehåller spikat sediment eller alternativt att vattnet spikas med testkemikalien efter tillsättning av larverna. Andelen kläckta chironomider, tid fram till kläckningen och könsfördelningen för fullständigt kläckta och levande myggor bedöms. Kläckta vuxna exemplar överförs till odlingsbehållare för att underlätta svärmning, parning och äggläggning. Antalet producerade äggband och deras fertilitet bedöms. Från dessa äggband erhålls andra generationens larver i första stadiet. Dessa larver placeras i nyberedda testbägare (samma spikningsförfarande som för den första generationen) för att fastställa den andra generationens livskraft genom en bedömning av andelen kläckta individer, tid fram till kläckningen och könsfördelningen för fullständigt kläckta och levande myggor (en schematisk presentation av livscykeltestet finns i tillägg 5). Alla data analyseras antingen med en regressionsmodell i syfte att uppskatta den koncentration som skulle orsaka X % minskning av endpointen i fråga, eller med hjälp av hypotesprövning för att bestämma koncentrationen utan observerad effekt (NOEC). Det senare kräver en jämförelse av behandlingsresponserna med lämpliga kontrollresponser med hjälp av statistiska tester. När det gäller snabbt nedbrytbara kemikalier bör noteras att i scenariot med spikat vatten kan de senare livsstadierna i varje generation (t.ex. puppfasen) exponeras för en betydligt lägre koncentrationsnivå i det överliggande vattnet än det första stadiets larver. Om detta är ett problem, och det behövs en jämförbar exponering i varje stadium av livscykeln, kan följande ändringar av testmetoden kan övervägas:

— parallella testomgångar med spikning under olika stadier i livscykeln, eller

— upprepad spikning (eller förnyelse av det överliggande vattnet) i testsystemet under båda testfaserna (första och andra generationen), varvid spikningsintervallerna (förnyelseintervallerna) bör anpassas till testkemikaliens egenskaper när det gäller dess omvandling, spridning och fördelning i miljön.

Sådana ändringar är endast möjliga i scenariot med spikat vatten, och inte i scenariot med spikat sediment.

INFORMATION OM TESTKEMIKALIEN

8. Testkemikaliens vattenlöslighet, ångtryck och log K_{ow}, uppmätta eller beräknade fördelning i sedimentet samt stabilitet i vatten och sediment bör vara kända. Det ska finnas en tillförlitlig analysmetod för kvantifiering av testkemikalien i det överliggande vattnet, porvattnet och sedimentet med känd och rapporterad noggrannhet och detektionsgräns. Användbar

▼M6

information inbegriper testkemikaliens strukturformel och renhet. Hur testkemikalien reagerar kemiskt (t.ex. upplösning, abiotisk och biotisk nedbrytning osv.) hör också till den information som är användbar. Närmare vägledning för testning av kemikalier vars fysikalisk-kemiska egenskaper gör dem svåra att testa finns i (16).

REFERENSKEMIKALIER

9. Referenskemikalier kan regelbundet testas för att säkerställa att känsligheten hos laboratoriets försöksdjurspopulation inte har ändrats. Med dafnier skulle det räcka att göra ett 48-timmars akut test (efter 17). Innan en validerad akut riktlinje finns tillgänglig kan man dock överväga att utföra ett kroniskt test enligt kapitel C.28 i denna bilaga. Exempel på toxiska referensämnen som med framgång har använts i ringtest och valideringsstudier är lindan, trifluranid, pentaklorfenol, kadmiumklorid och kaliumklorid (1) (3) (6) (7) (18).

TESTETS GILTIGHET

10. För att testet ska vara giltigt måste följande villkor uppfyllas:

— den genomsnittliga andelen kläckta djur i kontrollförfarandet bör vara minst 70 % i slutet av exponeringsperioden för båda generationerna (1) (7),

— för *C. riparius* och *C. yoshimatsui* bör 85 % av det totala antalet vuxna myggor från kontrollbehandlingen i båda generationerna kläckas mellan 12 och 23 dagar efter införandet av det första stadiets larver i kärlen. För *C. dilutus* är en period på 20 till 65 dagar godtagbar,

— den genomsnittliga könsfördelningen för fullständigt kläckta levande vuxna djur (som en andel honor eller hanar) i kontrollbehandlingen för båda generationerna bör vara minst 0,4 men högst 0,6,

— för varje odlingsbehållare bör antalet äggband i kontrollerna för den första generationen vara minst 0,6 per hona som har placerats i odlingsbehållaren,

— andelen fertila äggband i varje kontrollodlingsbehållare för den första generationen bör vara minst 0,6,

— i slutet av exponeringsperioden för båda generationerna bör pH-värdet och halten löst syre mätas i varje kärl. Syrekoncentrationen bör vara minst 60 % av luftmättnadsvärdet (ASV ([1])), och pH-värdet i det överliggande vattnet bör vara mellan 6 och 9 i alla testkärl,

— variationen i vattentemperaturen får inte vara större än ± 1,0 °C.

BESKRIVNING AV TESTMETODEN

Testkärl och odlingsbehållare

11. Larverna exponeras i 600 ml glasbägare som mäter cirka 8,5 cm i diameter (se tillägg 5). Även andra slags kärl kan användas, men då måste det gå att garantera att det överliggande vattnet och sedimentet har lämpliga djup. Sedimentytan bör vara tillräckligt stor för att ge 2–3 cm° per larv. Förhållandet mellan sedimentskiktets djup och det överliggande vattnets djup bör vara ca 1:4. Odlingsbehållare (minst 30 cm i samtliga tre

([1]) Vid 20 °C under det normala atmosfärtrycket motsvarar luftmättnadsvärdet i sötvatten 9,1 mg/l (60 % motsvarar 5,46 mg/l).

▼M6

dimensioner) med gasväv (maskstorlek ca 1 mm) åtminstone på ovansidan och den ena sidan av behållaren bör användas (se tillägg 5). En tvåliters kristalliseringsskål innehållande testvatten och sediment placeras i varje behållare för myggorna att lägga ägg i. Även för kristalliseringsskålen bör förhållandet mellan sedimentskiktets djup och det överliggande vattnets djup vara ca 1:4. Efter att äggbanden har samlas in från kristalliseringsskålen placeras de i en 12-brunnars mikrotiterplatta (ett band per brunn innehållande minst 2,5 ml vatten från den spikade kristalliseringsskålen) varefter plattorna täcks med ett lock för att förhindra betydande avdunstning. Andra kärl som är lämpliga att ha äggbanden i kan också användas. Med undantag för mikrotiterplattor bör alla testkärl och annan apparatur som kommer i kontakt med testsystemet vara gjorda uteslutande av glas eller annat kemiskt inert material (t.ex. polytetrafluoreten).

Val av art

12. Den art som används i testet ska helst vara *Chironomus riparius*. *C. yoshimatsui* kan också användas. *C. dilutus* kan också vara lämplig, men den är svårare att hantera och kräver en längre testperiod. Uppgifter om odlingsmetoder ges i tillägg 2 för *C. riparius*. Information om odlingsbetingelser finns också att tillgå för *C. dilutus* (5) och *C. yoshimatsui* (14). Identifieringen av arterna bör bekräftas före testningen men är inte nödvändig före varje test om organismerna härrör från en odling inom laboratoriet.

Sediment

13. Helst ska syntetiskt sediment användas (även kallat rekonstituerat eller konstgjort sediment). Om naturligt sediment används bör dess egenskaper dock fastställas (minst pH, halten organiskt kol, och gärna även andra parametrar såsom förhållandet C/N och granulometri). Sedimentet bör även vara fritt från föroreningar och andra organismer som kan konkurrera med eller leva på chironomiderna. Det rekommenderas också att sedimenten konditioneras före testet i sju dagar under testbetingelser. Följande syntetiska sediment, såsom beskrivs i (1), rekommenderas (1) (20) (21):

a. 4–5 % (torrvikt) vitmosstorv (*Sphagnum*), så nära pH 5,5–6,0 som möjligt. Det är viktigt att använda torv i pulverform, finmald (partikelstorlek ≤ 1 mm), och uteslutande lufttorkad,

b. 20 % (torrvikt) kaolinlera (kaolinithalt helst över 30 %),

c. 75–76 % (torrvikt) kvartssand (till största delen bestående av fin sand där mer än 50 % av partiklarna har storleken 50–200 μm),

d. avjonat vatten tillsätts så att blandningen får en slutlig fukthalt på omkring 30–50 %,

e. kemiskt rent kalciumkarbonat ($CaCO_3$) tillsätts för att justera den slutliga sedimentblandningens pH till 7,0 ± 0,5,

f. Den slutliga blandningens kolhalt bör vara 2 % (± 0,5 %) och kan justeras med hjälp av lämpliga mängder torv och sand, enligt punkterna (a) och (c).

14. Torvens, kaolinlerans och sandens ursprung ska vara känt. Sedimentkomponenterna ska kontrolleras med avseende på avsaknaden av kemiska

▼M6

föroreningar (t.ex. tungmetaller, organiska klorföreningar, organiska fosforföreningar). Ett exempel på hur syntetiskt sediment kan tillredas beskrivs i tillägg 3. Det är också godtagbart att blanda torra beståndsdelar om det går att visa att tillsats av överliggande vatten inte leder till att sedimentets beståndsdelar separerar (t.ex. flytande torvpartiklar) och att torven eller sedimentet konditionerats tillräckligt.

Vatten

15. Allt vatten som uppfyller de kemiska kriterierna för godtagbart utspädningsvatten (se tilläggen 2 och 4) är lämpligt som testvatten. Allt lämpligt vatten, naturligt vatten (ytvatten eller grundvatten), rekonstituerat vatten (se tillägg 2) och avklorerat kranvatten är godtagbart som odlings- och testvatten om chironomiderna överlever i det under odlingen och under testet utan att uppvisa tecken på stress. Vid teststart ska testvattnets pH vara mellan 6 och 9 och totalhårdheten får inte vara högre än 400 mg/l uttryckt som $CaCO_3$. Om man misstänker växelverkan mellan hårdhetsjoner och testkemikalien bör dock vatten med lägre hårdhet användas (och därmed bör Elendt Medium M4 inte användas i detta läge). Samma typ av vatten bör användas under hela undersökningen. De vattenkvalitetsegenskaper som förtecknas i tillägg 4 bör mätas minst två gånger om året eller om man misstänker att egenskaperna har ändrats betydligt.

Stamlösningar – spikat vatten

16. a. Testkoncentrationerna beräknas på grundval av koncentrationerna i det överliggande vattnet, dvs. vattnet ovanför sedimentet. Testlösningar av de valda koncentrationerna bereds i regel genom utspädning av en stamlösning. Stamlösningarna bör helst beredas genom upplösning av testkemikalien i testvattnet. I vissa fall kan det krävas lösningsmedel eller dispergeringsmedel för att få en stamlösning med lämplig koncentration. Lämpliga lösningsmedel är t.ex. aceton, etylenglykolmonoetyleter, etylenglykoldimetyleter, dimetylformamid och trietylenglykol. Dispergeringsmedel som kan användas är Cremophor RH40, Tween 80, metylcellulosa 0,01 % och HCO-40. Solubiliseringsmedlets koncentration i det slutliga testmediet bör vara minimal (t.ex. $\leq$ 0,1 ml/l) och bör vara samma för alla testkärl. Om ett solubiliseringsmedel används bör det inte ha någon betydande effekt på överlevnaden enligt vad som framkommer vid en lösningsmedelskontroll jämfört med en negativ (vatten-)kontroll. Man bör dock så långt som möjligt undvika att använda sådana ämnen.

Stamlösningar – spikat sediment

16. b. Spikat sediment med vald koncentration bereds i regel genom tillsättning av en lösning av testkemikalien direkt i sedimentet. En stamlösning av testkemikalien upplöst i avjonat vatten blandas med det syntetiska sedimentet i en rullkvarn, matningsblandare eller manuellt. Om testkemikalien är svårlöslig i vatten kan den lösas upp i minsta möjliga volym lämpligt organiskt lösningsmedel (t.ex. hexan, aceton eller kloroform). Denna lösning blandas sedan med 10 g fin kvartssand för varje testkärl. Lösningsmedlet får avdunsta och måste då helt avlägsnas ur sanden, och därefter blandas sanden med lämplig mängd sediment. Endast ämnen som avdunstar lätt får användas för att upplösa, dispergera eller emulgera testkemikalien. Man bör hålla i åtanke att den sand som följer med blandningen av

▼M6

testkemikalie och sand måste beaktas när sedimentet förbereds (dvs. sedimentet bör beredas med en mindre mängd sand). Man bör vara noga med att se till att testkemikalien som tillsätts sedimentet fördelas omsorgsfullt och jämnt i sedimentet. Vid behov kan delprover analyseras för att bestämma homogeniteten.

TESTETS UTFORMNING

17. Testets utformning avser antalet koncentrationer och intervallen mellan dem, antalet kärl per koncentration och antalet larver per kärl, antalet kristalliseringsskålar och odlingsbehållare. Utformning för EC_x, NOEC och för toleranstest beskrivs nedan.

Utformning för regressionsanalys

18. Den effektkoncentration (EC_x) och det koncentrationsintervall inom vilket effekterna av testkemikalien är av intresse bör omfattas av testet, så att endpointen inte extrapoleras utom ramarna för de data som genereras. Extrapolering långt under lägsta eller över högsta koncentration bör undvikas. Ett preliminärt (range-finding) test enligt testmetod C.27 eller C.28 kan vara till hjälp vid valet av lämpliga testkoncentrationsintervall.

19. För bestämning av EC_x krävs minst fem koncentrationer och åtta replikat för varje koncentration. För varje koncentration bör två odlingsbehållare användas (A och B). De åtta replikaten indelas i två grupper med fyra replikat till varje odlingsbehållare. Denna sammanslagning av replikat är nödvändig på grund av antalet myggor som behövs i behållaren för välgrundade bedömningar av reproduktionen. Den andra generationen har dock återigen åtta replikat, som påbörjas utifrån de exponerade populationerna i odlingsbehållarna. Faktorn mellan koncentrationerna bör inte vara större än två (undantag kan göras i fall där dos-respons-kurvan har liten lutning). Antalet replikat per testkärl kan minskas till sex (tre för varje odlingsbehållare) om antalet testkoncentrationer med olika responser ökas. En ökning av antalet replikat eller en minskning av testkoncentrationsintervallerna tenderar att leda till smalare konfidensintervall kring EC_x.

Utformning för bestämning av NOEC

20. För bestämning av NOEC bör fem testkoncentrationer med minst åtta replikat användas (fyra för varje odlingsbehållare, A och B), och faktorn mellan koncentrationerna bör inte vara större än två. Antalet replikat bör vara tillräckligt för att säkerställa tillräcklig statistisk giltighet för att upptäcka en skillnad på 20 % jämfört med kontrollen vid en signifikansnivå på 5 % ($\alpha = 0{,}05$). För utvecklingshastighet, fruktsamhet och fertilitet är det vanligen lämpligt att använda variansanalys (ANOVA), följd av Dunnetts eller Williams test (22–25). För andelen kläckta djur och könsfördelningen kan Cochran-Armitages test, Fishers exakta test (med Bonferronikorrigering) eller Mantel-Haentzals test vara lämpliga.

Toleranstest

21. Ett toleranstest kan utföras (en testkoncentration och kontroll(er)) om inga effekter observeras i det frivilliga preliminära testet upp till en högsta koncentration. Syftet med toleranstestet är att få en indikation om att testkemikaliens toxiska effekter förekommer vid nivåer som är högre än den testade gränskoncentrationen. För vatten föreslås 100 mg/l och 1 000 mg/kg för sediment (torrvikt). Normalt behövs minst åtta replikat

▼M6

både för testkärl och kontroll. Tillräcklig statistisk giltighet för att upptäcka en skillnad på 20 % jämfört med kontrollen vid en signifikansnivå på 5 % ($\alpha = 0{,}05$) bör påvisas. Eftersom t-testet ger kvantitativ respons (t.ex. utvecklingshastighet) är det en lämplig statistisk metod förutsatt att data uppfyller testkraven (normalitet, homogena varianser osv.). Om dessa krav inte uppfylls kan man använda t-testet med olika varians eller ett icke-parametriskt test, såsom Wilcoxon-Mann-Whitneys test. För andelen kläckta djur är Fishers exakta test lämpligt att använda.

FÖRFARANDE

Exponeringsförhållanden

Beredning av vatten/sediment-systemet (spikat vatten)

22. a. Syntetiskt sediment (se punkterna 13 och 14 samt tillägg 3) placeras i varje testkärl och kristalliseringsskål så att det bildar ett skikt på minst 1,5 cm (det kan vara något lägre i kristalliseringsskålen) men högst 3 cm. Vatten (se punkt 15) tillsätts så att förhållandet mellan sedimentskiktets djup och vattnets djup inte överskrider 1:4. Efter beredning av testkärlen bör sediment/vatten-systemet luftas skonsamt i ca sju dagar före tillsats av första stadiets larver i första eller andra generationen (se punkt 14 och tillägg 3). Sediment/vatten-systemet i kristalliseringsskålarna luftas inte under testets gång, eftersom det inte behöver stödja larvernas överlevnad (äggbanden samlas in redan före kläckningen). För att undvika separation av sedimentets beståndsdelar och återsuspension av finfördelat material medan testvatten tillsätts i vattenkolumnen kan sedimentet täckas med en plastplatta medan vattnet tillsätts. Plattan avlägsnas sedan omedelbart. Även andra metoder kan vara lämpliga.

Beredning av vatten/sediment-systemet (spikat sediment)

22. b. Spikade sediment som beretts enligt punkt 16b placeras i kärlen och i kristalliseringsskålen, och det överliggande vattnet tillsätts så att förhållandet mellan sediment- och vattenvolymen är 1:4. Sedimentskiktets djup bör ligga i intervallet 1,5–3 cm (det kan vara något lägre för kristalliseringsskålen). För att undvika separation av sedimentets beståndsdelar och återsuspension av finfördelat material medan testvatten tillsätts i vattenkolumnen kan sedimentet täckas med en plastplatta medan vattnet tillsätts, varefter plattan avlägsnas omedelbart. Även andra metoder kan vara lämpliga. Efter beredningen av spikat sediment och överliggande vatten rekommenderas att testkemikalien får fördela sig från sedimentet till vattenfasen (4) (5) (7) (18). Detta bör helst göras under samma temperatur- och luftningsbetingelser som används i testet. Den lämpliga stabiliseringstiden beror på sedimentet och kemikalien, och kan variera mellan några timmar och flera dagar, i sällsynta fall upp till fem veckor. Eftersom en lång stabiliseringstid kan leda till att många kemikalier sönderfaller eftersträvas här inte jämvikt, utan i stället rekommenderas en stabiliseringstid på 48 timmar. När halveringstiden för nedbrytning i sedimentet är känd för att vara lång (se punkt 8) kan stabiliseringstiden dock förlängas. I slutet av denna stabiliseringsperiod bör koncentrationen av testkemikalien mätas i det överliggande vattnet, porvattnet och sedimentet, åtminstone vid den högsta koncentrationen och en lägre koncentration (se punkt 38). Dessa analytiska bestämningar av testkemikalien gör det möjligt att beräkna massbalansen och uttrycka resultaten på grundval av uppmätta koncentrationer.

23. Testkärlen bör vara täckta (t.ex. med glasplattor). Vid behov kan vattennivåerna fyllas på under testets gång till deras ursprungliga volym för att kompensera för avdunstning. Detta bör göras med destillerat eller avjonat

▼M6

vatten för att förebygga ackumulering av salter. Kristalliseringsskålarna i odlingsbehållarna ska inte täckas och kan, men behöver inte nödvändigtvis, justeras för att kompensera för vattenförluster under testperioden, eftersom äggbanden endast kommer i kontakt med vattnet under ca en dag och skålarna endast används under en kort fas i testet.

Tillförsel av testorganismer

24. Fyra till fem dagar innan det första stadiets larver från den första generationen tillsätts bör äggmassorna avlägsnas från odlingen och placeras i små kärl i ett odlingsmedium. Mognat medium från stamodlingen eller ett nyberett medium kan användas. Under alla omständigheter bör en liten mängd foder, t.ex. några droppar filtrat från en finmald suspension av fiskfoder i flingform, tillsättas odlingsmediet (se tillägg 2). Endast nylagda äggmassor får användas. I regel börjar larverna kläckas några dagar efter att äggen har lagts (2–3 dagar för *C. riparius* vid 20 °C och 1–4 dagar för *C. dilutus* vid 23 °C och *C. yoshimatsui* vid 25 °C), och larvernas tillväxt sker i fyra stadier på 4–8 dagar per stadium. Första stadiets larver (högst 48 timmar efter kläckningen) bör användas i testet. Bestämningen av larvstadium kan eventuellt göras genom mätning av huvudkapseldiameter (7).

25. Tjugo första stadiets larver från den första generationen fördelas slumpvis i varje testkärl som innehåller sediment/vatten-systemet med hjälp av en trubbig pipett. Luftningen av vattnet stängs av medan larverna tillsätts i testkärlen och bör förbli avstängd under 24 timmar efter tillsättningen av larver (se punkt 32). Enligt det testupplägg som används (se punkterna 19 och 20) är antalet larver per testkoncentration minst 120 (6 replikat per koncentration) för bestämningen av EC_x och 160 för bestämningen av NOEC (8 replikat per koncentration). I scenariot med spikat sediment inleds exponeringen i och med tillsättningen av larverna.

Spikning av det överliggande vattnet

26. Tjugofyra timmar efter tillsättningen av första stadiets larver från den första generationen spikas den överliggande vattenkolumnen med testkemikalien, och en lätt luftning görs på nytt (för eventuella ändringar i testförfarandet, se punkt 7). Små volymer av stamlösningar med testkemikalien tillsätts under vattenytan med hjälp av en pipett. Därefter görs en försiktig omrörning av det överliggande vattnet utan att störa sedimentet. I scenariot med spikat vatten inleds exponeringen med spikningen av vattnet (dvs. en dag efter tillsättningen av larverna).

Insamling av nykläckta vuxna exemplar

27. Nykläckta myggor från den första generationen samlas in minst en gång, men helst två gånger per dag (se punkt 36) från testkärlen med hjälp av en aspirator, exhauster eller liknande anordning (se tillägg 5). Stor försiktighet bör iakttas för att inte skada de vuxna djuren. De insamlade myggorna från fyra testkärl inom en behandling släpps ut i den odlingsbehållare som de tidigare har tilldelats. På dagen då (hanarna) börjar kläckas spikas kristalliseringsskålarna genom att en liten mängd stamlösning med testkemikalien pipetteras ner under vattenytan (utformning med spikat vatten). Därefter görs en försiktig omrörning av det överliggande vattnet utan att störa sedimentet. Testkemikaliens koncentration i kristalliseringsskålen är praktiskt taget densamma som i det behandlingskärl som har avsatts för

▼M6

odlingsbehållaren i fråga. För utformningen med spikat sediment förbereds kristalliseringsskålarna ungefär på dag 11 efter exponeringens början (dvs. tillsatsen av den första generationens larver) så att de kan stabiliseras i cirka 48 timmar före de första äggbanden produceras.

28. Äggbanden samlas in från kristalliseringsskålarna i odlingsbehållarna med hjälp av en pincett eller en trubbig pipett. Varje äggband placeras i en behållare som innehåller odlingsmedium från den kristalliseringsskål som det insamlats ifrån (t.ex. ett hål i en 12-brunnars mikrotiterplatta tillsammans med minst 2,5 ml medium). Kärlen med äggbanden täcks med lock för att förhindra betydande avdunstning. Äggbanden hålls under observation under minst sex dagar efter att de har lagts så att de kan klassificeras som befruktade eller obefruktade.

För att initiera den andra generationen väljs minst tre, men helst sex, befruktade band ut från varje odlingsbehållare och tillåts att kläckas tillsammans med lite foder. Dessa äggband ska ha lagts när äggläggningen nådde sitt maximum, vilket normalt inträffar omkring testdag 19 i kontrollerna. Helst ska andra generationen i alla testkärl initieras på samma dag, men på grund av kemikaliens effekter på larvernas utveckling är detta emellertid inte alltid möjligt. I sådana fall kan de högre koncentrationerna initieras senare än de lägre behandlingarna och (lösningsmedels-)kontrollen.

29. a. I scenariot med spikat vatten bereds sediment/vatten-systemet för den andra generationen genom att den överliggande vattenkolumnen spikas med testämnet ca en timme före larverna i det första stadiet tillsätts i testkärlen. Små volymer av testkemikalielösningar tillsätts under vattenytan med hjälp av en pipett. Därefter görs en försiktig omrörning av det överliggande vattnet utan att störa sedimentet. Efter spikningen görs en lätt luftning.

29. b. I scenariot med spikat sediment bereds exponeringskärlen som innehåller sediment/vatten-systemet för den andra generationen på samma sätt som för den första generationen.

30. Tjugo larver i första stadiet (högst 48 timmar efter kläckningen) från den andra generationen fördelas slumpvis i varje testkärl som innehåller det spikade sediment/vatten-systemet med hjälp av en trubbig pipett. Luftningen av vattnet bör stängas av medan larverna i det första stadiet tillsätts i testkärlen och hållas avstängd i ytterligare 24 timmar efter tillsättning av larverna. Enligt det testupplägg som används (se punkterna 19 och 20) är antalet larver per testkoncentration minst 120 (6 replikat per koncentration) för bestämningen av EC_x och 160 för bestämningen av NOEC (8 replikat per koncentration).

Foder

31. Man måste utfodra larverna i testkärlen, helst dagligen eller minst tre gånger per vecka. En lagom mängd foder för unga larver under de första tio dagarna av deras utveckling är 0,25–0,5 mg fiskfoder (eller en suspension i vatten av finmalt foder, t.ex. Tetra-Min eller Tetra-Phyll, se uppgifter i tillägg 2) per larv och dag (0,35–0,5 mg för *C. yoshimatsui*). Något större mängder foder kan krävas för äldre larver: 0,5–1,0 mg per larv och dag bör vara tillräckligt för återstoden av testet. Fodergivan bör minskas i alla testkärl och kontroller om det uppstår svamptillväxt eller om mortalitet observeras i kontrollerna. Om svamptillväxten inte kan stoppas måste testet upprepas.

Den toxikologiska betydelsen av exponering via foderintag är i allmänhet högre för kemikalier med en hög affinitet för organiskt kol eller kemikalier som är kovalent bundna till sedimentet. När man testar kemikalier

▼M6

med sådana egenskaper kan dock den mängd foder som krävs för att säkerställa larvernas överlevnad och naturliga tillväxt tillsättas i det syntetiska sedimentet före stabiliseringsperioden, beroende på de föreskrivna kraven. För att förhindra försämring av vattenkvaliteten bör växtmaterial användas i stället för fiskfoder, t.ex. 0,5 % (torrvikt) finmalda blad från brännässla (*Urtica dioica*), mullbär (*Morus alba*), vitklöver (*Trifolium repens*), spenat (*Spinacia oleracea*) eller annat växtmaterial (*Cerophyl* eller alfacellulosa). Att tillsätta hela ransonen av en ekologisk foderkälla till sedimentet innan spikningen är inte försumbart när det gäller vattenkvaliteten och det biologiska resultatet (21), och är inte heller en standardmetod, men färska studier tyder på att denna metod fungerar (19) (26). De vuxna myggorna i odlingsbehållarna behöver normalt inget foder, men fruktsamheten och produktiviteten förbättras när bomullskompresser indränkta i mättad sackaroslösning erbjuds som en födokälla för vuxna exemplar (34).

Inkuberingsförhållanden

32. Skonsam luftning av det överliggande vattnet i testkärlen införs 24 timmar efter tillsättning av första stadiets larver i båda generationerna och får pågå under hela testet (se till att halten löst syre inte faller under 60 % av luftmättnadsvärdet (ASV)). Luftningen tillhandahålls genom en pasteurpipett av glas vars öppning fästs 2–3 cm ovanför sedimentlagret och släpper ut några bubblor per sekund. Vid testning av flyktiga kemikalier kan man överväga att utesluta luftningen av sediment/vattensystemet samtidigt som giltighetskriteriet rörande ett luftmättnadsvärde på minst 60 % (punkt 10) ska uppfyllas. Ytterligare vägledning finns i (16).

33. Testet med *C. riparius* genomförs vid en konstant temperatur på 20 °C (± 2 °C). För *C. dilutus* och *C. yoshimatsui* rekommenderas temperaturer på 23 °C respektive 25 °C (± 2 °C). En ljusperiod på 16 timmar används och ljusintensiteten ska vara 500–1 000 lux. För odlingsbehållarna kan ytterligare en timmes grynings- och skymningsfas ingå.

Exponeringstid

34. Utformning med spikat sediment: Exponeringsperioden för den första generationen inleds när testkemikalien spikas i det överliggande vattnet i testkärlen (dvs. en dag efter införandet av larver – för eventuella ändringar av exponeringsutformningen, se punkt 7). Exponeringen av den andra generationens larver inleds omedelbart, eftersom de har införts i ett sediment/vatten-system som redan är spikat. Den maximala exponeringstiden för den första generationen är 27 dagar och för den andra generationen 28 dagar (den första generationens larver tillbringar en dag i kärlen utan exponering) för *C. riparius* och *C. yoshimatsui*. Med tanke på överlappningen är testperioden ungefär 44 dagar totalt. För *C. dilutus* är de maximala exponeringstiderna 64 respektive 65 dagar för första och andra generationens larver. Den totala testperioden är ungefär 100 dagar.

Utformning med spikat sediment: exponeringen inleds i och med tillsättningen av larverna, och exponeringstiden är högst 28 dagar för båda generationerna för *C. riparius* och *C. yoshimatsui* och högst 65 dagar för båda generationerna för *C. dilutus*.

Observationer

Kläckning

35. Utvecklingstiden och det totala antalet fullständigt kläckta levande han- och honmyggor bestäms för båda generationerna. Hanarna är lätta att känna igen på sina fjäderantenner och smala kroppsställning.

▼M6

36. Testkärlen med båda generationerna bör granskas minst tre gånger i veckan för att visuellt bedöma förekomsten av onormalt beteende hos larverna (t.ex. exemplar som lämnar sedimentet, ovanligt simbeteende) jämfört med kontrollen. Under kläckningstiden, som inleds ca tolv dagar efter att larver för *C. riparius* och *C. yoshimatsui* införts (efter tjugo dagar för *C. dilutus*), räknas och könsbestäms de kläckta myggorna minst en gång, men helst två gånger om dagen (tidig morgon och sen eftermiddag). Efter identifieringen avlägsnas den första generationens myggor försiktigt från kärlen och överförs till en odlingsbehållare. Den andra generationens myggor avlägsnas och dödas efter identifiering. Alla äggband som lagts i den första generationens testkärl ska samlas in ett och ett och överföras tillsammans med minst 2,5 ml av testkärlens vatten till 12-brunnars mikrotiterplattor (eller annat lämpligt kärl) som täcks med lock för att förhindra betydande avdunstning. Antalet döda larver och synliga puppor som inte har kläckts bör också registreras. Exempel på odlingsbehållare, testkärl och exhauster finns i tillägg 5.

Reproduktion

37. Effekter på reproduktionen bedöms genom antalet äggband som produceras av den första generationens myggor och fertiliteten för dessa äggband. En gång per dag samlas äggbanden in från kristalliseringsskålen som placerats i varje odlingsbehållare. Äggbanden bör samlas in och överföras tillsammans med minst 2,5 ml av testkärlens vatten till 12-brunnars mikrotiterplattor (ett äggband i varje brunn) eller andra lämpliga kärl som täcks med lock för att förhindra betydande avdunstning. Följande egenskaper registreras för varje äggband: läggningsdag, storlek (normal, dvs. 1,0 ± 0,3 cm, eller liten, vanligtvis ≤ 0,5 cm) och struktur (normal = bananformad med spiralformad äggsnodd, eller onormal, t.ex. med rak äggsnodd) samt fertiliteten (fertilt eller sterilt). Under sex dagar efter läggningen bedöms fertiliteten hos varje äggband. Ett äggband anses vara fertilt när minst en tredjedel av äggen kläcks. Det totala antalet honor som tillsatts i odlingsbehållaren används för att beräkna antalet äggband per hona och antalet fertila äggband per hona. Om så krävs kan antalet ägg i ett äggband uppskattas utan att förstöra dem med hjälp av ringräkningsmetoden (se 32 och 33).

Analysmätningar

Testkemikaliens koncentration

38. Som ett minimum bör prover av det överliggande vattnet, porvattnet och sedimentet analyseras i början av exponeringen (helst en timme efter tillsatsen när det gäller spikat vatten) och i slutet av testet, vid den högsta koncentrationen och en lägre koncentration. Detta gäller för båda generationernas kärl. När det gäller kristalliseringsskålarna i odlingsbehållaren analyseras endast det överliggande vattnet, eftersom det är vad äggbanden kommer i kontakt med (i upplägget med spikat sediment kan man överväga att göra en analytisk bekräftelse av koncentrationen i sedimentet). Ytterligare mätningar av sedimentet, porvattnet eller det överliggande vattnet får utföras under testets gång om det anses nödvändigt. Dessa bestämningar av testkemikaliens koncentration ger information om testkemikaliens sätt att reagera/fördelning i vatten/sediment-systemet. Provtagningen av sedimentet och porvattnet vid testets inledning samt under testets gång (se punkt 39) kräver ytterligare testkärl för att utföra analytiska bestämningar. I upplägget med spikat vatten är det eventuellt inte

▼M6

nödvändigt att utföra mätningar i sedimentet om fördelningen av testkemikalien mellan vatten och sediment har fastställts tydligt under motsvarande betingelser (t.ex. förhållandet mellan sediment och vatten, appliceringstyp, sedimentets halt av organiskt kol), eller om de uppmätta koncentrationerna i det överliggande vattnet visar sig stadigt ligga inom 80–120 % av de nominella eller uppmätta startkoncentrationerna.

39. Om mellanliggande mätningar görs (t.ex. dag 7 och/eller 14) och om analysen kräver stora prover som inte kan tas från testkärlen utan att testsystemet påverkas, bör de analytiska bestämningarna göras på prover från ytterligare testkärl som behandlas på samma sätt (inklusive förekomsten av testorganismer) men som inte används för biologiska observationer.

40. Centrifugering t.ex. vid 10 000 g vid 4 °C i 30 minuter är det rekommenderade förfarandet för att isolera porvattnet. Om testämnet bevisligen inte adsorberas på filter kan även filtrering godtas. I vissa fall är det eventuellt inte möjligt att analysera koncentrationerna i porvattnet därför att provvolymen är för liten.

Fysikalisk-kemiska parametrar

41. Mätning av pH, löst syre i testvattnet och temperatur i testkärlen och kristalliseringsskålarna bör utföras på lämpligt sätt (se punkt 10). Hårdhet och ammoniak bör mätas i kontrollerna samt i ett testkärl och en kristalliseringsskål vid den högsta koncentrationen i början och slutet av testet.

DATA OCH RAPPORTERING

Behandling av resultaten

42. Syftet med detta livscykeltest är att bestämma hur testkemikalien påverkar reproduktionen och, i två generationer, utvecklingshastigheten och det totala antalet fullständigt kläckta levande han- och honmyggor. För andelen kläckta djur bör data rörande hanar och honor läggas samman. Om det inte finns några statistiskt signifikanta skillnader mellan känsligheten när det gäller utvecklingshastigheten för de båda könen var för sig kan resultaten för hanar och honor läggas samman för statistiska analyser.

43. Effektkoncentrationerna uttryckta som koncentrationer i det överliggande vattnet (för spikat vatten) eller i sedimentet (för spikat sediment) beräknas vanligen på grundval av uppmätta koncentrationer vid exponeringens början (se punkt 38). För spikat vatten beräknas medelvärdet för varje behandling av de koncentrationer som normalt sett uppmäts i början av exponeringen i det överliggande vattnet i kärlen för båda generationerna och i kristalliseringsskålarna. För spikat sediment beräknas medelvärdet av de koncentrationer som normalt sett uppmäts i början av exponeringen i kärlen för båda generationerna (och valfritt även i kristalliseringsskålarna) för varje behandling.

44. För att beräkna en punktvis uppskattning, dvs. ett EC_x-värde, kan statistiken per kärl och per odlingsbehållare användas som äkta replikat. Vid beräkning av konfidensintervallet för ett EC_x-värde bör variabiliteten mellan kärlen beaktas, eller så bör man påvisa att variabiliteten är så liten att den kan försummas. Om modellen anpassas med minsta kvadratmetoden bör transformation tillämpas på den kärlvisa statistiken i syfte att förbättra variansens homogenitet. EC_x-värdena bör dock beräknas när responsen har transformerats tillbaka till det ursprungliga värdet (31).

▼M6

45. När syftet med den statistiska analysen är att bestämma NOEC genom hypotestestning måste variabiliteten mellan kärlen beaktas, vilket garanteras om man använder ANOVA-metoder (t.ex. Williams och Dunnetts testförfaranden). Williams test kan vara lämpligt att använda när en monoton dos-respons förväntas i teorin, och Dunnetts test kan vara lämpligt om monotonitetshypotesen inte håller. Alternativt kan mer robusta tester (27) vara lämpliga i situationer där de vanliga ANOVA-antagandena inte gäller (31).

Andelen kläckta djur

46. Data rörande andelen kläckta djur är dikotoma (tvåpunktsfördelade) och kan analyseras genom Cochran-Armitages test som tillämpas på step-down-grund där en monoton dos-respons förväntas och dessa data stämmer överens med denna förväntning. Om inte, kan Fishers exakta test eller Mantel-Haentzals med Bonferroni-Holm-korrigerade p-värden användas. Om det finns bevis på större variabilitet mellan replikaten inom samma koncentration än en binomial fördelning skulle utvisa (ofta kallad ”extra-binomial” fördelning), bör man använda ett robust Cochran-Armitages test eller Fischers exakta test, såsom föreslås i (27).

Summan av levande myggor (hanar plus honor) som kläckts per kärl, n_e, bestäms och divideras med antalet tillsatta larver, n_a enligt följande:

$$ER = \frac{n_e}{n_a}$$

där

ER = andelen kläckta djur

n_e = antalet levande myggor som kläckts per kärl

n_a = antalet larver som tillsatts per kärl (normalt 20)

När n_e är större än n_a (dvs. när mer än det planerade antalet larver oavsiktligt infördes) bör n_a göras lika med n_e.

47. Ett alternativt tillvägagångssätt, som bäst lämpar sig för stora prov när det finns extra-binomial varians, är att behandla antalet kläckta djur som en kontinuerlig respons och använda förfaranden som är förenliga med dessa data för antalet kläckta djur. I detta sammanhang definieras begreppet ”stort prov” som ett prov där både antalet kläckta och antalet okläckta överstiger fem per replikatkärl.

48. Vid användning av ANOVA-metoder bör värdena för antalet kläckta djur först transformeras genom arcsin-kvadratsrotstransformation eller Freeman-Tukeytransformation för att få en ungefärlig normalfördelning och jämna ut varianserna. Cochran-Armitages test, Fishers exakta test (Bonferroni) eller Mantel-Haenszels test kan användas när absoluta frekvenser används. För att göra en arcsin-kvadratrotstransformation tar man inverterad sinus ($\sin^{-1}$) av kvadratroten av antalet kläckta djur.

49. För antalet kläckta djur beräknas EC_x-värdena med regressionsanalys (t.ex. probit-, logit- eller Weibullmodellerna (28)). Om regressionsanalysen inte lyckas (om det t.ex. finns mindre än två partiella responser) kan man använda andra icke-parametriska metoder, såsom glidande medelvärde eller enkel interpolering.

Utvecklingshastighet

50. Med genomsnittlig utvecklingstid avses den genomsnittliga tidsperioden mellan tillsättningen av larver (testdag 0) och kläckningen av den experimentella kohorten myggor (för beräkning av den faktiska utvecklingstiden bör man ta hänsyn till larvernas ålder vid tillsättningstidpunkten).

▼M6

Utvecklingshastigheten (enhet: 1/dag) är det reciproka värdet av tidsenheten för utveckling och representerar den andel larvutveckling som sker per dag. Utvecklingshastigheten är det mått som helst ska användas för utvärdering av dessa sedimenttoxicitetsstudier eftersom variansen är lägre och homogenare samt ligger närmare normalfördelningen i jämförelse med utvecklingstiden. Mer kraftfulla parametriska testförfaranden kan alltså användas baserade på utvecklingshastighet i stället för på utvecklingstid. För utvecklingshastigheten som en kontinuerlig respons kan EC_x-värden uppskattas med hjälp av regressionsanalys (t.ex. (29) (30)). NOEC för den genomsnittliga utvecklingshastigheten kan fastställas med hjälp av ANOVA-metoder, t.ex. Dunnetts eller Williams test. Eftersom hanar kläcks tidigare än honor, dvs. har en högre utvecklingshastighet, är det lämpligt att beräkna utvecklingshastigheten för vartdera könet separat utöver utvecklingshastigheten för alla myggor totalt.

51. För statistiska test antas antalet myggor observerade på inspektionsdag x ha kläckts i mitten av tidsintervallet mellan dag x och dag x – l (l är inspektionsintervallets längd, i regel en dag). Den genomsnittliga utvecklingshastigheten per kärl ($\bar{x}$) beräknas enligt följande:

$$\bar{x} = \sum_{i=1}^{m} \frac{f_i X_i}{n_e}$$

där

$\bar{x}$: genomsnittlig utvecklingshastighet per kärl

i: index för inspektionsintervall

m: maximalt antal inspektionsintervall

f_i: antal myggor som kläckts under inspektionsintervallet i

n_e: totalt antal myggor som kläckts i slutet av experimentet (Σf_i)

x_i: utvecklingshastighet för myggor som kläckts under intervallet i

$$x_i = 1/dag_i - \frac{l_i}{2}$$

där

dag_i: inspektionsdag (dagar från införandet av larverna)

l_i: inspektionsintervallets längd i (dagar, i regel en dag)

Könsfördelning

52. Data rörande könsfördelningen är dikotoma (tvåpunktsfördelade) och bör därför utvärderas genom ett Fishers exakta test eller andra lämpliga metoder. Den naturliga könsfördelningen för *C. riparius* är ett, dvs. hanar och honor är lika många. Data rörande könsfördelningen bör behandlas på samma sätt för båda generationerna. Eftersom det högsta antalet myggor per kärl (dvs. 20) är för lågt för att en meningsfull statistisk analys ska

▼M6

kunna utföras, lägger man ihop det totala antalet fullständigt kläckta levande myggor av varje kön för alla kärlen i en behandling. Dessa otransformerade data testas mot kontrollen (med lösningsmedel) eller mot hoplagda data för kontrollerna i en 2 × 2 kontingenstabell.

Reproduktion

53. Reproduktionen, uttryckt som fekunditet, beräknas som antalet äggband per hona. Mer exakt divideras det totala antalet äggband som producerats i en odlingsbehållare med det totala antalet levande och oskadade honor som tillsatts denna behållare. NOEC för fekunditeten kan fastställas med hjälp av ANOVA-metoder, t.ex. Dunnetts eller Williams test.

54. Äggbandens fertilitet används för att fastställa antalet fertila äggband per hona. Det totala antalet fertila äggband som produceras i en odlingsbehållare divideras med det totala antalet levande och oskadade honor som tillsatts denna behållare. NOEC för fertiliteten kan fastställas med hjälp av ANOVA-metoder, t.ex. Dunnetts eller Williams test.

Testrapport

55. Testrapporten ska innehålla följande uppgifter:

Testkemikalie:

— fysikalisk natur och fysikalisk-kemiska egenskaper (vattenlöslighet, ångtryck, log K_{ow}, fördelningskoefficient i jord (eller i sediment, om denna uppgift finns tillgänglig), stabilitet i vatten och sediment etc.),

— kemiska identifieringsdata (trivialnamn, kemiskt namn, strukturformel, CAS-nummer osv.) inklusive renhet och analysmetod för kvantifiering av testkemikalien.

Testade arter:

— de testorganismer som använts: art, vetenskapligt namn, ursprung och odlingsbetingelser,

— information om hur äggmassorna och larverna hanterats,

— information om hanteringen av vuxna exemplar från den första generationen med hjälp av en exhauster osv. (se tillägg 5),

— den ålder testorganismerna från den första och andra generationen hade vid tidpunkten för införandet i provkärlen.

Testbetingelser:

— det sediment som använts (dvs. naturligt eller syntetiskt (konstgjort) sediment),

— naturligt sediment: insamlingsplatsens belägenhet och en beskrivning av denna plats (inklusive, om möjligt, föroreningshistoria); sedimentets egenskaper: pH, halten av organiskt kol, C/N-kvot och granulometri (om tillämpligt),

— syntetiskt sediment: beredning, beståndsdelar och egenskaper (halten organiskt kol, pH, fukthalt osv. vid testets början),

— beredning av testvatten (om rekonstituerat vatten används) och egenskaper (syrehalt, pH, hårdhet osv. vid testets början).

▼M6

— sediments och det överliggande vattnets djup i testkärlen och kristalliseringsskålarna,

— det överliggande vattnets och porvattnets volym, det våta sedimentets vikt med och utan porvatten för testkärlen och kristalliseringsskålarna,

— testkärl (material och storlek),

— kristalliseringsskålar (material och storlek),

— odlingsbehållare (material och storlek),

— metoden för beredning av stamlösningar och testkoncentrationer för testkärlen och kristalliseringsskålarna,

— applicering av testkemikalien i testkärlen och kristalliseringsskålarna: testkoncentrationer, antal replikat och lösningsmedel om sådana behövs,

— inkuberingsförhållanden för testkärlen: temperatur, ljuscykel och intensitet, luftning (bubblor per sekund),

— inkuberingsförhållanden för odlingsbehållarna och kristalliseringsskålarna: temperatur, ljuscykel och intensitet,

— inkuberingsförhållanden för äggbanden i mikrotiterplattorna (eller andra typer av kärl): temperatur, ljuscykel och intensitet,

— detaljerad information om utfodringen, inklusive typ av foder, beredning, mängd och utfodringsschema.

Resultat:

— nominella testkoncentrationer, uppmätta testkoncentrationer och resultaten av alla analyser för att fastställa koncentrationen av testkemikalien i testkärlen och kristalliseringsskålarna,

— vattenkvaliteten i testkärlen och kristalliseringsskålarna, dvs. pH, temperatur, löst syre, hårdhet och ammoniak,

— ersättning av avdunstat testvatten för testkärlen, i förekommande fall,

— antalet kläckta hon- och hanmyggor per kärl och dag för första och andra generationen,

— könsfördelning för fullständigt kläckta levande myggor per behandling för första och andra generationen,

— antalet larver som inte utvecklats till myggor per kärl för första och andra generationen,

— procentandel/andel kläckta exemplar per replikat- och testkoncentration (han- och honmyggor sammanlagt) för första och andra generationen,

— den genomsnittliga utvecklingshastigheten för fullständigt kläckta och levande myggor per replikat och behandlingsnivå (han- och honmyggor separat och även sammanlagt) för första och andra generationen,

— antalet äggband som lagts i kristalliseringskärlen per odlingsbehållare och dag,

▼M6

— egenskaperna hos varje äggband (storlek, form och fertilitet),

— fekunditet – det totala antalet äggband per totalt antal honor som tillsatts i odlingsbehållaren,

— fertilitet – det totala antalet fertila äggband per totalt antal honor som tillsatts i odlingsbehållaren,

— uppskattning av toxiska endpoints, t.ex. EC_x (och därmed förbundna konfidensintervall), NOEC och de statistiska metoder som använts för bestämningen av dem,

— diskussion av resultaten, inbegripet eventuell inverkan på testresultatet som kan tillskrivas avvikelser från denna testmetod.

LITTERATUR

(1) Kapitel C.28 i denna bilaga, Toxicitetstest i sediment- och vattenfas på Chironomid-larver med kontaminerat vatten.

(2) Shobanov, N. A., Kiknadze, I. I. och M. G. Butler (1999), Palearctic and Nearctic *Chironomus* (*Camptochironomus*) *tentans* Fabricius are different species (Diptera: Chironomidae). Entomologica Scandinavica, 30: 311–322.

(3) Fleming, R. m.fl. (1994), Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances, Slutlig rapport till Europeiska kommissionen, rapport nr EC 3738. augusti 1994. WRc, Storbritannien.

(4) SETAC (1993), Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments, från WOSTA:s workshop i Nederländerna.

(5) ASTM International (2009), E 1706-05E01: Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates, In: Annual Book of ASTM Standards, vol. 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, andra upplagan, EPA 600/R-99/064, mars 2000, omarbetning av den första upplagan daterad 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) Milani, D., Day, K. E., McLeay, D. J. och 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, Kanada.

(11) Norberg-King, T. J., Sibley, P. K., Burton, G. A., Ingersoll, C. G., Kemble, N. E., Ireland, S., Mount, D. R. och 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) Taenzler, V., Bruns, E., Dorgerloh, M., Pfeifle, V. och L. Weltje (2007), Chironomids: suitable test organisms for risk assessment investigations on the potential endocrine-disrupting properties of pesticides, Ecotoxicology, 16: 221–230.

(13) Sugaya, Y. (1997), Intra-specific variations of the susceptibility of insecticides in *Chironomus yoshimatsui, Jp*. J. Sanit. Zool., 48: 345–350.

(14) Kawai, K. (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 denna bilaga, Toxicitetstest i sediment- och vattenfas på Chironomid-larver med kontaminerat 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 nr 23, ENV/JM/MONO(2000)6, OECD, Paris.

(17) Weltje, L., Rufli, H., Heimbach, F., Wheeler, J., Vervliet-Scheebaum, M. och 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) Oetken, M, Nentwig, G., Löffler, D, Ternes, T. och J. Oehlmann (2005), Effects of pharmaceuticals on aquatic invertebrates, Part I, The antiepileptic drug carbamazepine, Arch. Environ. Contam. Toxicol., 49. 353–361.

(20) Suedel, B. C. and J. H. Rodgers (1994), Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing, Environ. Toxicol. Chem., 13: 1163–1175.

(21) Naylor, C. och C. Rodrigues (1995), Development of a test method for *Chironomus riparius* using a formulated sediment, Chemosphere, 31: 3291–3303.

(22) Dunnett, C. W. (1964), A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statis. Assoc., 50: 1096–1121.

(23) Dunnett, C. W. (1964), New tables for multiple comparisons with a control, Biometrics, 20: 482–491.

(24) 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.

(25) Williams, D. A. (1972), The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics, 28. 510–531.

(26) Jungmann, D., Bandow, C., Gildemeister, T., Nagel, R., Preuss, T. G., Ratte, H. T., Shinn, C., Weltje, L. och 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) Rao, J. N. K. och A. J. Scott (1992), A simple method for the analysis of clustered binary data. Biometrics, 48. 577–585.

(28) Christensen, E. R. (1984), Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model, Water Res., 18: 213–221.

▼**M6**

(29) Bruce, R. D. and D. J. Versteeg (1992), A statistical procedure for modelling continuous toxicity data, Environ. Toxicol. Chem., 11: 1485–1494.

(30) Slob, W. (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 nr 54, 146 s., ENV/JM/MONO(2006)18, OECD, Paris.

(32) Benoit, D. A., Sibley, P. K., Juenemann, J. L. och 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) Vogt, C., Belz, D., Galluba, S., Nowak, C., Oetken, M. och 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, utkommande skrift i Series on Testing and Assessment, OECD, Paris.

▼M6

Tillägg 1

Definitioner

I denna testmetod gäller följande definitioner:

Kemikalie: ett ämne eller en blandning.

Syntetiskt sediment eller rekonstituerat eller konstgjort sediment: en blandning av material som är avsedda att efterlikna de fysiska beståndsdelarna i naturligt sediment.

Överliggande vatten: det vatten som täcker sedimentet i testkärlet.

Porvatten: det vatten som finns i mellanrummen mellan sediment- eller jordpartiklar.

Spikat vatten: testvatten till vilket testkemikalien har tillsatts.

Testkemikalie: varje ämne eller blandning som testas med denna testmetod.

▼M6

Tillägg 2

Rekommendationer för odling av *Chironomus riparius*

1. *Chironomus*-larver kan odlas i kristalliseringskärl eller större behållare. Fin kvartssand sprids ut i ett tunt skikt på cirka 5–10 mm på behållarens botten. Kiselgur (t.ex. Merck, Art. 8117) har visat sig vara ett lämpligt substrat (det räcker med ett tunt lager på några mm). Lämpligt vatten tillsätts sedan till ett djup på flera cm. Vattennivåerna bör fyllas på efter behov för att ersätta avdunstat vatten och förebygga uttorkning. Vattnet kan ersättas vid behov. Skonsam luftning bör tillhandahållas. De kärl som innehåller larver bör förvaras i en lämplig behållare som hindrar kläckta exemplar från att rymma. Behållaren bör vara tillräckligt stor för att de vuxna exemplaren ska kunna svärma, annars kan kopulationen utebli (minimum är cirka 30 × 30 × 30 cm).

2. Behållarna ska hållas i rumstemperatur eller i ett tempererat utrymme vid 20 ± 2 °C med en fotoperiod på 16 timmar ljus (intensitet ca 1 000 lux) och 8 timmar mörker. Det har rapporterats att en luftfuktighet på under 60 % relativ luftfuktighet kan hämma reproduktionen.

Utspädningsvatten

3. Allt lämpligt naturligt eller syntetiskt vatten kan användas. Ofta används källvatten, avklorerat kranvatten och artificiella medier (t.ex. Elendt M4 eller M7, se nedan). Vattnet måste luftas före användningen. Vid behov kan odlingsvattnet förnyas genom att man försiktigt häller eller med en hävert tappar av använt vatten från odlingskärlen utan att förstöra larvrören.

Utfodring av larver

4. *Chironomus*-larverna ges fiskfoder i flingform (Tetra Min ®, Tetra Phyll ® eller motsvarande patenterat märke), cirka 250 mg per kärl och dag. Detta kan ges som torrt malet pulver eller som en suspension i vatten: tillsätt 1,0 g flingfoder i 20 ml utspädningsvatten och blanda till en homogen blandning. Beredningen kan ges med en dosering på cirka 5ml per kärl och dag (skaka om före användning). Äldre larver kan få en större dos.

5. Utfodringen justeras i enlighet med vattenkvaliteten. Om odlingsmediet blir grumligt bör dosen sänkas. Foderdoseringen måste övervakas noggrant. För liten mängd leder till att larverna emigrerar mot vattenkolumnen och för stor mängd leder till ökad mikrobiell aktivitet och lägre syrekoncentrationer. Båda omständigheterna kan leda till minskad tillväxt.

6. Även celler av vissa grönalger (t.ex. *Scenedesmus subspicatus*, *Chlorella vulgaris*) kan tillsättas när nya odlingskärl inrättas.

Utfodring av vuxna exemplar

7. Vissa testutövare har föreslagit att bomullskompresser indränkta i mättad sackaroslösning kan användas som foder för vuxna exemplar.

▼M6

Kläckning

8. Vid 20 ± 2 °C börjar de vuxna exemplaren kläckas i odlingskärlen efter cirka 13–15 dagar. Hanarna är lätta att känna igen på sina fjäderantenner och smala kroppar.

Äggmassor

9. När vuxna exemplar finns i odlingsbehållaren bör alla odlingskärl kontrolleras tre gånger per vecka för att se om geléartade äggmassor har lagts. Om sådana upptäcks, bör de försiktigt avlägsnas. Äggmassorna överförs till ett litet kärl som innehåller ett prov av odlingsvattnet. De används sedan för att starta nya odlingskärl (t.ex. 2–4 äggmassor per kärl) eller för toxicitetstest.

10. Första stadiets larver bör kläckas efter 2–3 dagar.

Inrättning av nya odlingskärl

11. När odlingarna är etablerade bör det vara möjligt att inrätta ett nytt odlingskärl för larver varje vecka eller med längre intervall beroende på testningskraven. Äldre kärl avlägsnas efter att de vuxna myggorna har kläckts. På detta sätt får man en regelbunden tillgång till vuxna exemplar med minimalt behov av skötsel.

Beredning av testlösningarna M4 och M7

12. M4-mediet har beskrivits i Elendt (1990). M7-mediet bereds på samma sätt som M4-mediet med undantag för de ämnen som anges i tabell 1, för vilka koncentrationerna är fyra gånger lägre i M7 jämfört med M4. Testlösningen ska inte beredas enligt Elendt och Bias (1990) eftersom de koncentrationer av $NaSiO_3 \cdot 5H_2O$, $NaNO_3$, KH_2PO_4 och K_2HPO_4 som anges för beredning av stamlösningar inte är lämpliga.

Beredning av M7-medium

13. Varje stamlösning (I) bereds för sig och en kombinerad stamlösning (II) bereds av dessa stamlösningar (I) (se tabell 1). Femtio ml av den kombinerade stamlösningen (II) och de mängder av varje stamlösning med makronäring som anges i tabell 2 samt avjonat vatten tillsätts upp till 1 liter för att bereda M7-mediet. En stamlösning med vitaminer bereds genom att man tillsätter tre vitaminer till avjonat vatten enligt tabell 3, och 0,1 ml av den kombinerade vitaminstamlösningen tillsätts till det slutliga M7-mediet strax före användningen. Vitaminstamlösningen förvaras djupfryst i små alikvoter. Mediet luftas och stabiliseras.

Tabell 1

Stamlösningar av spårelement för M4- och M7-medium

Stamlösningar (I)	Mängd (mg) som fylls upp till 1 liter med avjonat vatten	För den kombinerade stamlösningen (II): blanda följande mängder (ml) stamlösning (I) och fyll upp till 1 liter med avjonat vatten		Slutliga koncentrationer i testlösningarna (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**

Stamlösningar (I)	Mängd (mg) som fylls upp till 1 liter med avjonat vatten	För den kombinerade stamlösningen (II): blanda följande mängder (ml) stamlösning (I) och fyll upp till 1 liter med avjonat vatten		Slutliga koncentrationer i testlösningarna (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)	1991	20,0	5,0	1,0	0,249

(1) Dessa ämnen skiljer sig åt i M4 och M7, såsom anges ovan.
(2) Dessa lösningar bereds separat, blandas därefter och autoklaveras omedelbart.

Tabell 2:

Stamlösningar med makronäringsämnen för medium M4 och M7

	Mängd som fylls upp till 1 liter med avjonat vatten (mg)	Mängd stamlösning med makronäringsämnen som tillsätts för att bereda medium M4 och M7 (ml/l)	Slutliga koncentrationer i testlösningarna M4 och 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**

Tabell 3:

Stamlösningar med vitaminer för medium M4 och M7

Alla tre vitaminlösningarna kombineras till en enda vitaminstamlösning.

	Mängd som fylls upp till 1 liter med avjonat vatten (mg)	Mängd stamlösning med vitaminer som tillsätts för att bereda medium M4 och M7 (ml/l)	Slutliga koncentrationer i testlösningarna M4 och M7 (mg/l)
Tiaminhydroklorid	750	0,1	0,075
Cyanokobalamin (B12)	10	0,1	0,0010
Biotin	7,5	0,1	0,00075

HÄNVISNINGAR

BBA (1995), Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system, red. M. Streloke och H. Köpp. Berlin.

Elendt, B. P. (1990), Selenium deficiency in Crustacea, Protoplasma, 154: 25–33.

Elendt, B. P. och 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

Tillägg 3

Beredning av syntetiskt sediment

SEDIMENTSAMMANSÄTTNING

Syntetiskt sediment ska ha följande sammansättning:

Beståndsdel	Egenskaper	% av sedimentets torrvikt
Torv	Vitmosstorv (*Sphagnum*), så nära pH 5,5–6,0 som möjligt, utan synliga växtrester, finfördelad (partikelstorlek ≤ 1 mm) och lufttorkad	4–5
Kvartssand	Partikelstorlek: > 50 % av partiklarna bör vara av storleken 50–200 μm	75–76
Kaolinlera	Kaolinithalt ≥ 30 %	20
Organiskt kol	Justeras genom tillsats av torv och sand	2 (± 0,5)
Kalcium-karbonat	$CaCO_3$, i pulverform, kemiskt rent	0,05–0,1
Vatten	Konduktivitet ≤ 10 μS/cm	30–50

BEREDNING

Torven lufttorkas och mals ner till ett fint pulver. En suspension med den erforderliga mängden torvpulver i avjonat vatten bereds med hjälp av en högpresterande homogeniseringsapparat. Suspensionens pH justeras till 5,5 ± 0,5 med $CaCO_3$. Suspensionen konditioneras i minst två dagar med skonsam omrörning vid 20 ± 2 °C för att stabilisera pH-värdet och etablera en stabil mikrobiell komponent, varefter pH mäts på nytt och då bör vara 6,0 ± 0,5. Torvsuspensionen blandas sedan med de övriga beståndsdelarna (sand och kaolinlera) och avjonat vatten till ett homogent sediment med en vattenhalt som ligger på omkring 30–50 procent av sedimentets torrvikt. Därefter mäts den slutliga blandningens pH på nytt och justeras vid behov till 6,5–7,5 med $CaCO_3$. Prover tas av sedimentet för att bestämma torrvikten och halten organiskt kol. Likaså rekommenderas att det syntetiska sediment som ska användas i ett chironomidtoxicitetstest konditioneras före användningen i sju dagar under samma betingelser som råder i det efterföljande testet.

FÖRVARING

Det syntetiska sedimentets torra beståndsdelar kan lagras i ett torrt och svalt utrymme vid rumstemperatur. Berett (vått) sediment ska inte lagras innan det används i ett test. Det bör användas omedelbart efter den sju dagar långa konditioneringsperioden, som är sista steget i beredningen.

HÄNVISNINGAR

OECD (1984), *Earthworm, Acute Toxicity Test*, Test Guideline No. 207, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris.

Meller, M., Egeler, P., Roembke, J., Schallnass, H., Nagel, R. och 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**

Tillägg 4

Ett godtagbart utspädningsvattens kemiska egenskaper

BESTÅNDSDEL	KONCENTRATIO-NER
Partiklar	< 20 mg/l
Halt av organiskt kol	< 2 mg/l
Ojoniserad ammoniak	< 1 µg/l
Hårdhet som $CaCO_3$	< 400 mg/l (*)
Resterande mängd klor	< 10 µg/l
Total mängd bekämpningsmedel som innehåller organiska fosforföreningar	< 50 ng/l
Total mängd bekämpningsmedel som innehåller organiska klorföreningar plus polyklorerade bifenyler	< 50 ng/l
Total mängd organiskt klor	< 25 ng/l

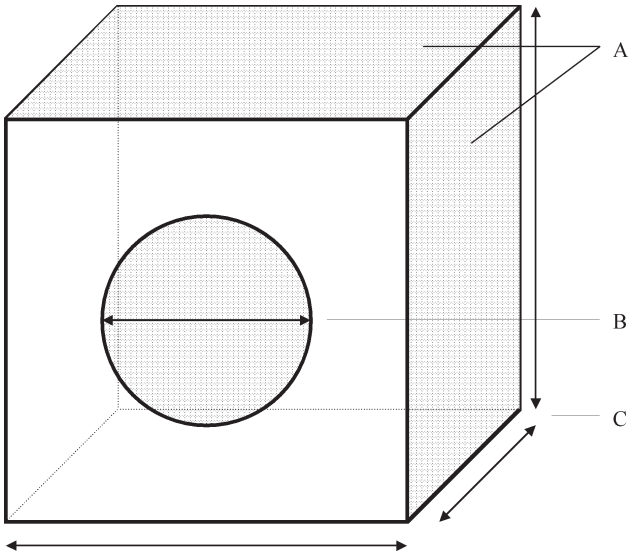
(*) Om man misstänker växelverkan mellan hårdhetsjoner och testkemikalien bör dock vatten med lägre hårdhet användas (och därmed bör Elendt Medium M4 inte användas i detta läge).

▼**M6**

Tillägg 5

Riktlinjer för testets genomförande

Exempel på en odlingsbehållare:



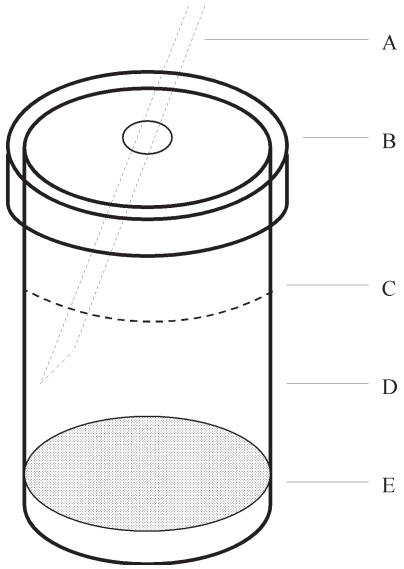
A: gasväv på ovansidan och åtminstone den ena sidan av behållaren (maskstorlek ca 1 mm)

B: öppning för placering av kläckta adulta exemplar i odlingsbehållaren och för avlägsnande av de äggband som lagts i kristalliseringsskålen (visas ej i denna figur)

C: odlingsbehållarens storlek minst 30 cm längd, 30 cm höjd och 30 cm bredd

▼**M6**

Exempel på ett testkärl:



A: pasteurpipett för lufttillförsel i det överliggande vattnet

B: glaslock som förhindrar de kläckta myggorna från att rymma

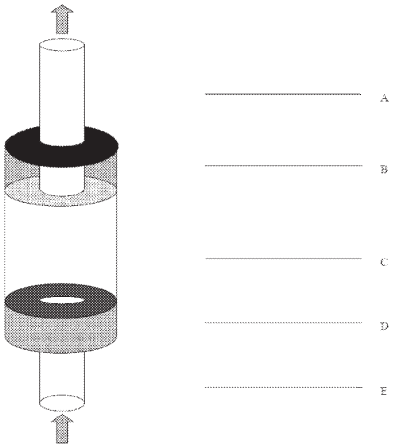
C: vattnets ytskikt

D: testkärl (glasbägare, minst 600 ml)

E: sedimentskikt

▼**M6**

Exempel på en exhauster som används för att insamla vuxna myggor (pilarna anger flödesriktningen):



A: glasrör (innerdiameter ca 5 mm) som är ansluten till en självsugande pump

B: kork av mjukgummi, perforerad med glasrör (A). På insidan täcks öppningen av glasröret (A) med lite bomull och gasväv (maskstorlek ca 1 mm) för att förhindra att myggorna skadas när man suger upp dem i exhaustern

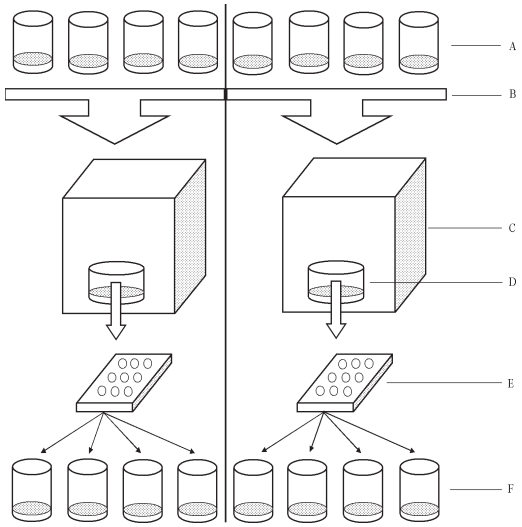
C: genomskinlig behållare (plast eller glas, längd ca 15 cm) för de infångade myggorna

D: kork av mjukgummi, perforerad med rör (E). För att släppa ut myggorna i odlingsbehållaren avlägsnas kork D från behållare C

E: rör (plast eller glas, innerdiameter ca 8 mm) för insamling av vuxna myggor från kärlet

▼**M6**

Schematisk presentation av ett livscykeltest:



A: första generationen – testkärl som innehåller ett sediment/vatten-system, åtta replikat och tjugo första stadiets larver per kärl

B: fyra testkärl för varje odlingsbehållare, A och B

C: odlingsbehållare (A och B) för svärmning, parning och äggläggning

D: kristalliseringsskålar i vilka äggbanden läggs

E: mikrotiterplattor, en brunn för varje äggband

F: andra generationen – testkärl som innehåller ett sediment/vatten-system, åtta replikat och tjugo första stadiets larver per kärl.

▼M6

C.41 TEST PÅ FISKARS KÖNSUTVECKLING

INLEDNING

1. Denna testmetod motsvarar OECD:s testriktlinje (TG) 234 (2011). Den bygger på ett beslut från 1998 att utveckla nya eller uppdatera befintliga testmetoder för screening och testning av potentiellt hormonstörande ämnen. Testet på fiskars könsutveckling (Fish Sexual Development Test, FSDT) konstaterades vara en lovande metod som täcker ett känsligt livsstadium som kan påverkas av både östrogen- och androgenliknande kemikalier. Testmetoden genomgick ett valideringstest mellan laboratorier från 2006 till 2010, där japanska risfiskar (*Oryzias latipes*), sebrafisk (*Danio rerio*) och storspigg (*Gasterosteus aculeatus*) validerades, och knölskallelöja (*Pimephales promelas*) delvis validerades (41) (42) (43). Detta protokoll omfattar japansk risfisk, storspigg och sebrafisk. Protokollet är i princip en förbättring av OECD TG 210: *Fish, Early Life Stage Toxicity Test* (1) som föreskriver att exponeringen fortsätter till dess att fiskarna är könsdifferentierade, dvs. cirka 60 dagar efter kläckningen för japansk risfisk, storspigg och sebrafisk (exponeringstiden kan vara kortare eller längre för andra arter som godkänns i framtiden) och endokrinkänsliga endpoints läggs till. Testet på fiskars könsutveckling bedömer effekterna på tidiga utvecklingsstadier och de eventuella negativa konsekvenserna av förmodat hormonstörande kemikalier (t.ex. östrogener, androgener och hämmare av steroidogenes) på könsutvecklingen. Kombinationen av två centrala endokrina endpoints, koncentrationen av vitellogenin (VTG) och den fenotypiska könsfördelningen, gör att testet kan indikera testkemikaliens verkningssätt. På grund av den populationsrelevanta förändringen av den fenotypiska könsfördelningen kan testet på fiskars könsutveckling användas för faro- och riskbedömning. Om testet används för faro- och riskbedömning bör man dock inte använda storspigg, eftersom de valideringsdata som hittills finns att tillgå visar att i denna art är ändringar av den fenotypiska könsfördelningen på grund av testkemikalier ovanliga.

2. Protokollet bygger på fiskar som exponeras via vattnet för kemikalier under deras könslabila period, under vilken fisken förväntas vara mest känslig för effekterna av hormonstörande kemikalier som kan störa könsutvecklingen. Två centrala endpoints mäts som indikatorer på dessa hormonrelaterade avvikelser: VTG-koncentrationerna och könsfördelningen (förhållandet mellan könen), som fastställs via histologisk analys av könskörtlarna. Histopatologisk analys av könskörtlarna (utvärdering och stadieindelning av oocyter och spermatogena celler) är frivillig. Dessutom bestäms det genetiska könet närhelst det är möjligt (t.ex. i japanska risfiskar och storspigg). Förekomsten av en genetisk könsmarkör är en avsevärd fördel, eftersom den ökar giltigheten av statistiken över könsfördelningen och möjliggör upptäckter av individuella fenotypiska könsbyten. Andra apikala endpoints som ska mätas inbegriper andelen kläckta djur, överlevnad, längd och kroppsvikt. Testmetoden kan anpassas till andra arter än de som anges ovan under förutsättning att de övriga arterna genomgår en validering som motsvarar den som genomförts för japanska risfiskar, storspigg och sebrafisk, att fiskarna i kontrollerna är könsdifferentierade vid testets slut, att VTG-nivåerna är tillräckligt höga för att man ska kunna upptäcka betydande kemikalierelaterade variationer, och att testsystemets känslighet fastställs med hjälp av endokrint aktiva referenskemikalier ((anti-)östrogener, (anti-)androgener, aromatashämmare, etc.). Dessutom ska alla valideringsrapporter som hänvisar till data från testet på fiskars könsutveckling i vilket andra arter har testats granskas av OECD, och resultatet av valideringen bör anses vara tillfredsställande.

▼M6

Inledande överväganden och begränsningar

3. VTG produceras vanligen i levern hos honor av äggläggande ryggradsdjur som respons på cirkulerande endogent östrogen (2). Det är en prekursor till ägguleproteiner, och när det väl har producerats i levern förs det med blodet till äggstockarna, där det tas upp och modifieras av ägg som är under utveckling. VTG-syntesen är mycket begränsad, men är påvisbar i ungfisk och vuxna hanfiskar eftersom de saknar tillräcklig mängd cirkulerande östrogen. Levern kan dock producera och utsöndra VTG som respons på exogen stimulans av östrogen (3) (4) (5).

4. Mätning av VTG gör det möjligt att påvisa kemikalier med östrogena, antiöstrogena och androgena verkningssätt samt kemikalier som stör steroidogenesen, som till exempel aromatashämmare. Man kan påvisa ämnen med östrogena kemikalier genom mätning av VTG-induktionen hos hanfiskar, och detta har dokumenterats många gånger i den fackgranskade vetenskapliga litteraturen. VTG-induktion har också påvisats efter exponering för aromatiserbara androgener (6) (7). En minskning av nivåerna av cirkulerande östrogen hos honor, till exempel genom hämning av aromatas som omvandlar det endogena androgenet till det naturliga östrogenet 17-beta-östradiol, orsakar en minskning av VTG-koncentrationen som används för att påvisa kemikalier med aromatashämmande egenskaper eller mer allmänna steroidogeneshämmare (33). Den biologiska relevansen av den VTG-respons som följer östrogen- och aromatashämning har fastställts och har dokumenterats i stora drag (8) (9). Det är dock möjligt att produktionen av VTG hos honor även kan påverkas av allmän toxicitet och icke-endokrina toxiska verkningssätt.

5. Flera mätmetoder har framgångsrikt utvecklats och standardiserats för rutinmässig användning för att kvantifiera VTG i blodprov, leverprov, helkroppsprov eller huvud/stjärthomogenatprov som samlats in från enskilda fiskar. Detta är fallet för sebrafiskar, storspigg och japanska risfiskar, och även för den delvis validerade arten knölskallelöja. Artspecifika metoder för ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) som använder immunokemi för kvantifiering av VTG finns att tillgå (5) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16). I japanska risfiskar och sebrafisk finns det en god korrelation mellan VTG mätt i blodplasma-, lever- och homogenatprover även om homogenater tenderar att uppvisa något lägre värden än plasma (17) (18) (19). Tillägg 5 innehåller de rekommenderade förfarandena för provtagning för analys av VTG.

6. Förändringar i den fenotypiska könsfördelningen (könsproportioner) är en endpoint som återspeglar könsbyten. I princip kan östrogener, antiöstrogener, androgener, antiandrogener och steroidogeneshämmande kemikalier påverka könsfördelningen hos ungfiskar som håller på att utvecklas (20). Det har visat sig att dessa könsbyten delvis är reversibla hos sebrafiskar (21) efter exponering för östrogenliknande kemikalier, medan könsbyten efter exponering för androgenliknande kemikalier är permanenta (30). Könet definieras som honkön, hankön, intersexuellt (såväl oocyter och spermatogena celler förekommer i samma könskörtel) eller odifferentierat, fastställt i enskilda fiskar genom histologisk undersökning av könskörtlarna. Vägledning ges i tillägg 7 och i OECD:s vägledningsdokument *Diagnosis of Endocrine-Related Histopathology of Fish Gonads* (22).

7. Genetiskt kön analyseras via genetiska markörer när dessa förekommer hos en viss fiskart. Hos japanska risfiskar kan de honliga XX- eller hanliga XY-generna påvisas genom polymeraskedjereaktion (PCR), eller så kan den Y-länkade DM-domängenen (DMY) analyseras (DMY-negativ eller -positiv)

▼M6

på det sätt som beskrivs i (23) (24). Hos storspigg finns en motsvarande PCR-metod för bestämning av genetiskt kön som beskrivs i tillägg 10. När det genetiska könet kan länkas individuellt till det fenotypiska könet förbättras testets tillförlitlighet och därför bör det genetiska könet bestämmas för arter med dokumenterade genetiska könsmarkörer.

8. Kombinationen av två viktiga endokrina endpoints, VTG och könsfördelning, kan påvisa kemikaliens endokrina verkningssätt (tabell 1). Könsfördelningen är en populationsrelevant biomarkör (25) (26), och för vissa väldefinierade verkningssätt kan resultaten från testet på fiskars könsutveckling användas för faro- och riskbedömning när så anses lämpligt av den reglerande myndigheten. Dessa verkningssätt är för närvarande östrogener, androgener och steroidogeneshämmare.

Tabell 1

De endokrina endpoints reaktion på de olika verkningssätten hos kemikalier:

↑ = ökning, ↓ = minskning, — = ej undersökt

Verkningssätt	VTG ♂	VTG ♀	Könsfördelning	Hänvisningar
Svag östrogenagonist	↑	↑	↑♀ eller ↑odiff.	(27) (40)
Stark östrogenagonist	↑	↑	↑♀ eller ↑odiff., inga ♂	(28) (40)
Östrogenantagonist	—	—	↓♀, ↑odiff.	(29)
Androgenagonist	↓ eller —	↓ eller —	↑ ♂, inga ♀	(28) (30)
Androgenantagonist	—	—	↑♀ ↑intersexuellt	(31)
Aromatashämmare	↓	↓	↓♀	(33)

9. Testet på fiskars könsutveckling omfattar inte fiskens reproduktiva livsstadium och därför bör kemikalier som misstänks påverka fortplantningen vid lägre halter än könsutvecklingen undersökas i ett test som omfattar reproduktionen.

10. Definitioner som används i denna testmetod finns i tillägg 1.

11. In vivo-testet på fiskars könsutveckling är avsett att påvisa kemikalier med androgena och östrogena egenskaper såväl som antiandrogena, antiöstrogena och steroidogeneshämmande egenskaper. Valideringsfaserna i testet på fiskars könsutveckling (1 och 2) omfattade östrogena, androgena och steroidogeneshämmande kemikalier. Effekterna i testet på fiskars könsutveckling av östrogen- och androgenantagonister framgår av tabell 1, men dessa verkningssätt är för närvarande mindre dokumenterade.

PRINCIP FÖR TESTMETODEN

12. I testet exponeras fisken, från nyligen befruktat ägg till och med genomgången könsdifferentiering, för minst tre koncentrationer av testkemikalien upplöst i vatten. Testbetingelserna bör vara genomflödestest såvida detta inte är möjligt på grund av testkemikaliens tillgänglighet eller beskaffenhet (t.ex. begränsad löslighet). Testet inleds med att de nyligen befruktade äggen (före groddskivans klyvning) placeras i testbehållarna. Fyllandet av behållarna

▼M6

beskrivs för varje art i punkt 27. För de validerade fiskarterna, japansk risfisk, storspigg och sebrafisk, avslutas testet på dag 60 efter kläckningen. Vid slutet av testet avlivas alla fiskar på ett humant sätt. Ett biologiskt prov (blodplasma, lever eller huvud/stjärthomogenat) samlas in för analys av VTG från varje fisk, och den återstående delen fixeras för en histologisk utvärdering av könskörtlarna för att fastställa det fenotypiska könet. Alternativt kan en histopatologisk analys utföras (t.ex. stadiebestämning av könskörtlarna och graden av intersexualitet). Ett biologiskt prov (anal- eller ryggfenan) för bestämning av genetiskt kön tas för arter med lämpliga markörer (tillägg 9 och 10).

13. En översikt över de relevanta testbetingelser som är specifika för validerade arter (japansk risfisk, storspigg och sebrafisk) återfinns i tillägg 2.

INFORMATION OM TESTKEMIKALIEN

14. Resultat från ett akut toxicitetstest eller annat korttidstest av toxicitet (t.ex. testmetod C.14 (34) och OECD TG 210 (1)), som helst ska ha utförts med samma art som används för detta test, bör finnas tillgängliga. Detta innebär att testkemikaliens vattenlöslighet och ångtryck är kända och att en tillförlitlig analysmetod för kvantifiering av kemikalien i testbehållarna, med känd och rapporterad noggrannhet och detektionsgräns, finns att tillgå.

15. Annan användbar information inbegriper strukturformel, kemikaliens renhet, stabilitet i vatten och ljus, pKa, P_{ow} samt resultaten från ett test avseende lätt bionedbrytbarhet (testmetod C.4) (35).

Kriterier för godkännande av testet

16. För att testresultaten ska kunna godtas måste följande villkor uppfyllas:

— Halten löst syre bör vara minst 60 procent av luftmättnadsvärdet (ASV) under hela testet.

— Vattentemperaturen bör inte variera med mer än ± 1,5 °C mellan olika testbehållare vid någon tidpunkt under exponeringsperioden och bör hållas inom de temperaturgränser som specificerats för den art som används (se tillägg 2).

— En validerad metod för analys av exponeringskemikalien med en detektionsgräns som ligger långt under den lägsta nominella koncentrationen bör finnas tillgänglig och belägg bör samlas in för att visa att testkemikaliens koncentrationen i lösningen har på ett tillfredsställande sätt hållits inom ± 20 % av de genomsnittliga uppmätta värdena.

— Den totala överlevnaden för de befruktade äggen i kontrollgrupperna, och i tillämpliga fall i kontrollerna med lösningsmedel, måste vara större än eller lika med de gränsnivåer som definieras i tillägg 2.

— Godkännandekriterierna rörande tillväxt och könsförhållanden vid slutet av testet bygger på data från kontrollgruppen (de sammanlagda kontrollerna för lösningsmedel och vatten, såvida de inte är betydligt olika – då enbart lösningsmedlet):

▼M6

		Japansk risfisk	Sebrafisk	Storspigg
Tillväxt	Den avtorkade fiskens våtvikt	>150 mg	>75 mg	>120 mg
	Längd (normallängd)	>20 mm	>14 mm	>20 mm
Könsfördelning (% hanar och honor)		30–70 %	30–70 %	30–70 %

— Om ett lösningsmedel används bör det inte ha en statistiskt signifikant effekt på överlevnaden och bör inte ha några hormonstörande eller andra skadliga verkningar på tidiga levnadsstadier enligt vad som framkommit av en lösningsmedelskontroll.

Om en avvikelse från kriterierna för godkännande av testet observeras, bör konsekvenserna av detta betraktas i förhållande till testuppgifternas tillförlitlighet. Dessa överväganden bör ingå i rapporteringen.

BESKRIVNING AV TESTMETODEN

Testbehållare

17. Alla typer av behållare av glas, rostfritt stål eller annat kemiskt inert material kan användas. Måtten på behållarna bör vara tillräckligt stora för att uppfylla fisktäthetskriterierna som anges nedan. Testbehållarna ska helst placeras slumpvis i testutrymmet. En randomiserad blockutformning med en koncentration per block är att föredra framför en fullständigt randomiserad utformning. Testbehållarna bör avskärmas från oönskade störningar.

Val av art

18. Rekommenderade fiskarter anges i tillägg 2. Förfarandena för att införa nya arter anges i punkt 2.

Skötsel av föräldragenerationen

19. Närmare uppgifter om lämplig skötsel av föräldragenerationen under tillfredsställande betingelser finns i OECD TG 210 (1). Föräldragenerationen bör utfodras en eller två gånger per dag med lämpligt foder.

Hantering av embryon och yngel

20. Till att börja med kan embryon och yngel exponeras inom huvudbehållaren i mindre kammare av stål eller glas försedda med sidor eller ändar av nät som möjliggör ett flöde av testkemikalien genom kammaren. För att få ett icke-turbulent flöde genom dessa små kammare kan de hängas på en arm som sänker och höjer kamrarna (de får dock inte höjas över ytan).

21. Om äggbehållare, galler eller nät har använts för att hålla äggen inom huvudbehållaren tas dessa tillbehör bort efter att ynglen har kläckts, med undantag av nät som behövs för att hålla fiskarna på plats. Om ynglen måste flyttas får de inte utsättas för luft, och håvar får inte användas för att släppa ut fiskarna från äggbehållarna. Överföringstidpunkten varierar beroende på art och det är inte alltid nödvändigt med en överföring.

▼M6

Vatten

22. Allt vatten i vilket testarternas kontrollgrupper har minst lika hög överlevnadsgrad som i sådant vatten som beskrivs i tillägg 3 är lämpligt som testvatten. Vattnet ska hålla jämn kvalitet under hela testperioden. För att säkerställa att utspädningsvattnet inte påverkar testresultaten på oönskat sätt (t.ex. genom att reagera med testkemikalien) eller negativt påverkar avelsbeståndets förutsättningar, ska vattenprover regelbundet tas för analys. Den totala halten organiskt kol, konduktiviteten, pH-värdet och mängden uppslammade partiklar bör mätas exempelvis var tredje månad när utspädningsvattnets kvalitet är känd för att vara relativt jämn. Mätningar av tungmetaller (t.ex. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd och Ni), viktiga anjoner och katjoner (t.ex. ca Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-}, SO_4^{2-}) samt bekämpningsmedel bör göras om vattenkvaliteten kan ifrågasättas. Uppgifter om kemisk analys och insamling av vatten återfinns i punkt 34.

Testlösningar

23. Genomflödessystem bör användas om det är praktiskt möjligt. För genomflödestest behövs ett system som kontinuerligt släpper ut och späder ut en stamlösning av testkemikalien (t. ex. med mätpump, proportionalitetslösningssystem och mättnadskärlsystem) för att tillföra en serie koncentrationer till testbehållarna. Stamlösningens och utspädningsvattnets flödeshastighet bör kontrolleras regelbundet under testets gång och får inte variera med mer än 10 % under hela testet. En flödeshastighet som motsvarar minst fem testbehållarvolymer per 24 timmar har konstaterats vara lämplig (1). Man bör vara noga med att undvika att använda plaströr eller andra material som kan innehålla biologiskt aktiva kemikalier eller som kan adsorbera testkemikalien.

24. Stamlösningen bör helst beredas utan användning av lösningsmedel genom att helt enkelt blanda eller skaka testkemikalien i utspädningsvattnet på mekanisk väg (t.ex. omrörning eller ultraljud). Om testkemikalien är svårlöslig i vatten bör man följa de förfaranden som beskrivs i OECD:s vägledningsdokument om akvatisk toxicitetstestning av svåra ämnen och blandningar (36). Man bör undvika att använda lösningsmedel, men det kan i vissa fall vara nödvändigt för att framställa en stamlösning med lämplig koncentration. Exempel på lämpliga lösningsmedel ges i (36).

25. Semistatiska testbetingelser bör undvikas om de inte kan motiveras med tvingande skäl som är förbundna med testkemikalien (t.ex. stabilitet, begränsad tillgänglighet, höga kostnader eller risker). Vid ett semistatiskt test kan man välja mellan två olika förnyelseförfaranden. Antingen kan nya testlösningar beredas i rena behållare och de överlevande äggen och ynglen försiktigt överföras till de nya behållarna, eller så kan testorganismerna vara kvar i kärlen medan en andel (minst två tredjedelar) av testvattnet byts ut varje dag.

FÖRFARANDE

Exponeringsförhållanden

Insamling av ägg och varaktighet

26. För att undvika systematiska genetiska avvikelser samlas ägg in från minst tre avelspar eller avelsgrupper, blandas och väljs slumpvis ut för att inleda testet. För storspigg, se beskrivningen av konstgjord befruktning i tillägg 11. Testet bör inledas så snart som möjligt efter befruktningen av äggen. Embryona ska helst befinna sig i testlösningarna innan groddskivornas klyvning

▼M6

inleds, eller så snart som möjligt efter denna tidpunkt och senast tolv timmar efter befruktningen. Testet bör fortsätta tills könsdifferentieringen i kontrollgruppen är avslutad (60 dagar efter kläckningen för japansk risfisk, storspigg och sebrafisk).

Djurtäthet

27. Antalet befruktade ägg vid testperiodens början bör vara minst 120 per koncentration uppdelade mellan minst fyra replikat (det är godtagbart att använda kvadratrotsfördelning till kontrollen). Äggen ska fördelas slumpmässigt (med hjälp av statistiska tabeller för randomisering) mellan testkärlen. Fisktätheten (för definition, se tillägg 1) får inte vara högre än att halten löst syre kan hållas vid minst 60 % av luftmättnadsvärdet utan direkt luftning av behållarna. För genomflödestester rekommenderas en fisktäthet som inte överskrider 0,5 g/l per 24 timmar och som inte vid någon tidpunkt överskrider 5 g/l lösning. Senast 28 dagar efter befruktningen bör antalet fiskar per replikat omfördelas, så att varje replikat innehåller ett så lika antal fiskar som möjligt. Vid exponeringsrelaterad dödlighet bör antalet replikat minskas på lämpligt sätt så att fisktätheten mellan behandlingsnivåerna förblir så lika som möjligt.

Ljus och temperatur

28. Fotoperioden och vattentemperaturen bör vara anpassade efter den art som testas (se tillägg 2 för försöksbetingelser för testet på fiskars könsutveckling).

Utfodring

29. Foder och utfodring är av avgörande betydelse, och det är viktigt att man vid lämpliga tidsintervaller ger rätt foder för varje stadium och i en tillräckligt stor mängd för att stödja normal tillväxt. Fiskarna bör ha fri tillgång till foder (ad libitum), men överutfodring bör undvikas i möjligaste mån. För att få en tillräcklig tillväxttakt bör fiskarna utfodras minst två gånger per dag (under veckosluten kan en gång per dag vara godtagbart), med minst tre timmars mellanrum mellan varje utfodring. Överbliven mat och avföring bör avlägsnas, om så behövs, för att undvika ackumulering av avfallsprodukter. Allteftersom erfarenheterna tilltar förfinas kontinuerligt utfodringsprogrammen för att förbättra överlevnaden och optimera tillväxten. Man måste därför försöka bekräfta det föreslagna systemet hos erkända experter. Inget foder bör ges 24 timmar innan testet avslutas. Exempel på lämpligt foder finns i tillägg 2 (se även OECD:s *Fish Testing Framework* (39).

Testkoncentrationer

30. Testkemikalierna bör ha den spridning som beskrivs i tillägg 4. Minst tre testkoncentrationer med minst fyra replikat bör användas. När man väljer koncentrationsintervall är det viktigt att beakta kurvan som visar sambandet mellan LC_{50} och exponeringsperioden i befintliga undersökningar av akut toxicitet. Fem testkoncentrationer rekommenderas om erhållna data ska användas för riskbedömning.

31. Koncentrationer av kemikalien som är högre än 10 % av det akuta LC_{50}-värdet för vuxna djur eller 10 mg/l, beroende på vilket som är lägre, behöver inte testas. Den maximala testkoncentrationen bör vara 10 % av LC_{50} för larvstadiet/ungfiskstadiet.

▼M6

Kontroller

32. En kontroll med utspädningsvatten (≥ 4 replikat) och, i förekommande fall, en lösningsmedelskontroll (≥ 4 replikat) bör inrättas utöver testkoncentrationerna. Endast lösningsmedel som har befunnits inte ha en statistiskt signifikant effekt på testets statistiska endpoints bör användas i testet.

33. Om ett lösningsmedel används får dess slutkoncentration inte överskrida 0,1 ml/l (36), och koncentrationen bör vara densamma i alla testbehållare, utom i kontrollen med utspädningsvatten. Man bör dock sträva efter att undvika sådana lösningsmedel eller att hålla lösningsmedlets koncentrationer till ett minimum.

Frekvens för analytiska bestämningar och mätningar

34. En kemisk bestämning av testkemikaliens koncentration bör genomföras före testets början för att kontrollera att godtagbarhetskriterierna uppfylls. Alla replikat bör analyseras var för sig i början och slutet av testet. Ett replikat per testkoncentration analyseras minst en gång per vecka under testets gång, och man bör då växla systematiskt mellan replikaten (1,2,3,4,1,2…). Om proverna lagras för att analyseras vid en senare tidpunkt bör förvaringsmetoden för proverna ha validerats i förväg. Proverna bör filtreras (t.ex. med porstorlek 0,45 μm) eller centrifugeras för att se till att de analytiska bestämningarna görs på kemikalien i äkta lösning.

35. Under testets gång ska löst syre, pH, total hårdhet, konduktivitet, salthalt (om relevant) och temperatur mätas i alla testbehållare. Som ett minimum bör löst syre, salthalt (om relevant) och temperatur mätas varje vecka, och pH, konduktivitet och hårdhet i början och i slutet av testet. Temperaturen ska helst övervakas kontinuerligt i minst en testbehållare.

36. Resultaten bör baseras på de uppmätta koncentrationerna. Om testkemikaliens koncentration i lösningen på ett tillfredsställande sätt har hållits inom ± 20 % av den nominella koncentrationen under hela testperioden kan dock resultaten antingen grunda sig på nominella eller på uppmätta värden.

Observationer och mätningar

Det embryonala utvecklingsstadiet

37. Exponeringen ska inledas så snart som möjligt efter befruktningen, innan groddskivans klyvning påbörjas och senast 12 timmar efter befruktningen för att garantera exponering under den tidiga embryonala utvecklingen.

Kläckning och överlevnad

38. Observationer av kläckning och överlevnad bör göras minst en gång per dag. Alla antal bör registreras. Döda embryon, yngel och ungfisk bör avlägsnas så snart de observeras, eftersom nedbrytningen går snabbt och de kan sönderdelas av de andra fiskarna. Man bör iaktta stor försiktighet när döda individer avlägsnas så att man inte stöter till eller orsakar fysiska skador på närliggande ägg eller yngel, eftersom de är extremt ömtåliga och känsliga. Dödskriterierna varierar beroende på levnadsstadiet:

— för ägg: i synnerhet i tidiga stadier, en tydligt förlust av genomskinlighet och färgförändringar orsakade av koagulering och/eller utfällning av protein, vilket leder till ett vitt ogenomskinligt utseende,

▼M6

— för yngel och ungfisk: orörlighet och/eller avsaknad av andningsrörelse och/eller avsaknad av hjärtslag och/eller en vit ogenomskinlig färgning av centrala nervsystemet och/eller avsaknad av reaktion på mekanisk retning.

Onormalt utseende

39. Antalet yngel eller fisk som har onormal kroppsform bör registreras, och missbildningens utseende och beskaffenhet beskrivas. Det bör noteras att onormala embryon och yngel även förekommer av naturliga skäl, och kan för vissa arter uppgå till flera procent i kontrollgruppen (kontrollgrupperna). Onormala djur bör inte avlägsnas från testbehållarna förrän de avlider. Enligt Europaparlamentets och rådets direktiv 2010/63/EU av den 22 september 2010 om skydd av djur som används för vetenskapliga ändamål ska djuren sövas och avlivas i enlighet med beskrivningen i punkt 44 om missbildningar leder till smärta, lidande och ångest eller bestående skador, och deras död tillförlitligt kan förutsägas. De avlivade djuren registreras under ”dödlighet” för dataanalys.

Onormalt beteende

40. Abnormiteter, t.ex. hyperventilering, okoordinerat simbeteende, atypisk passivitet och avvikande ätbeteende, bör registreras när de först uppträder.

Vikt

41. I slutet av testet avlivas alla överlevande fiskar (eller bedövas om blodprov ska tas), och våtvikten för varje (avtorkad) individ mäts.

Längd

42. Vid testets slut mäts individernas längd (normallängd).

43. Dessa observationer leder till att några eller alla av följande uppgifter är tillgängliga för rapportering:

— kumulativ dödlighet,

— antal friska exemplar vid testets avslutning,

— tidpunkten för kläckningens början och slut,

— de överlevande djurens längd och vikt,

— antal deformerade yngel,

— antal fiskar som beter sig onormalt.

Provtagning på fisk

44. Provtagning på fiskarna utförs vid slutet av testet. Provtagningsfiskarna avlivas med t.ex. MS-222 (100–500 mg per liter buffrad med 200 mg $NaHCO_3$ per liter) eller FA-100 (4-allyl-2-metoxifenol: eugenol) och mäts och vägs var för sig som våtvikt (avtorkade) eller bedövade om ett blodprov ska tas (se punkt 49).

Provtagning för analys av VTG och könsbestämning genom histologisk utvärdering

45. Prover bör tas på alla fiskar och de bör sedan beredas för analys av kön och VTG. Alla fiskar bör undersökas histologiskt för att bestämma könet. För att

▼M6

mäta VTG godtas ett delprov från minst 16 fiskar från varje replikat. Fler fiskar bör analyseras rörande VTG om resultaten i delprovet visar sig vara oklara.

46. Provtagningsmetoderna för VTG och könsbestämningen är beroende av analysmetoden för VTG:

Huvud/stjärthomogenatmetoden för analys av VTG

47. Fisken avlivas. Huvudet och stjärten på varje fisk skiljs från kroppen genom snitt som görs rakt bakom bröstfenorna och rakt bakom ryggfenan med en skalpell (se figur 1). Huvud- och stjärtdelarna från varje fisk läggs samman, vägs och numreras individuellt, fryses i flytande kväve och lagras vid – 70 °C eller kallare för analys av VTG. Fiskarnas kropp numreras och fixeras i ett lämpligt fixativ för histologisk utvärdering (22). Med hjälp av denna metod utvärderas VTG och histopatologin för varje individ, och en eventuell ändring av VTG-nivån kan sålunda sättas i samband med fiskens fenotypiska eller genetiska kön (japansk risfisk och storspigg). För ytterligare information, se riktlinjerna för homogenisering (tillägg 5) och för kvantifiering av VTG (tillägg 6).

Leverhomogenatmetoden för analys av VTG

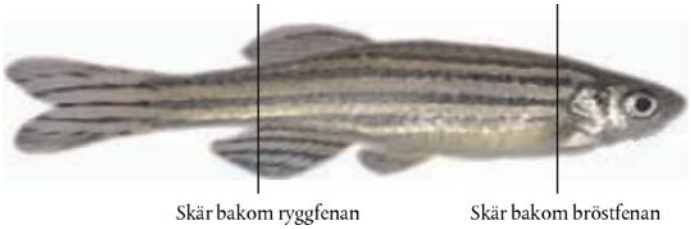
48. Fisken avlivas. Levern dissekeras ut och lagras vid – 70 °C eller kallare. Rekommenderade förfaranden för excision och förbehandling av levern finns i OECD TG 229 (37) eller kapitel C.37 i denna bilaga (38). Levrarna homogeniseras sedan var för sig på det sätt som beskrivs i OECD TG 229 eller kapitel C.37 i denna bilaga. Supernatanten samlas upp och används för mätning av VTG med en motsvarande ELISA-teknik (se bilaga 6 som innehåller ett exempel på kvantifiering för sebrafisk eller OECD TG 229 (37) för japansk risfisk). Enligt detta tillvägagångssätt är det också möjligt att få uppgifter om enskilda fiskar, både rörande VTG och könskörtlarnas histologi.

Blodplasmametoden för analys av VTG

49. Blod samlas in från de bedövade fiskarna genom hjärtpunktering eller snitt i den kaudala venen eller i stjärten och centrifugeras vid 4 °C för insamling av plasma. Plasman lagras vid – 70 °C eller kallare fram till användningen. Hela fisken avlivas och fixeras för histologi. Både plasmaproven och fiskarna numreras individuellt för att man ska kunna relatera VTG-nivåerna till fiskens kön.

Figur 1

Hur man skär upp en fisk för mätning av VTG i huvud/stjärthomogenatet och histologisk utvärdering av den mellersta delen



▼M6

Bestämning av genetiskt kön

50. Ett biologiskt prov för bestämning av genetiskt kön tas från enskilda fiskar som tillhör arter som har lämpliga markörer. För japansk risfisk insamlas analfenan eller ryggfenan. En detaljerad beskrivning finns i tillägg 9, inklusive vävnadsprovtagning och könsbestämning genom en PCR-metod. Även för storspigg finns en beskrivning av vävnadsprovtagning och PCR-metod för könsbestämning i tillägg 10.

Mätning av VTG

51. Mätning av VTG bör baseras på en kvantitativt och analytiskt validerad metod. Information bör finnas tillgänglig om variabiliteten rörande tester inom och mellan laboratorier för den metod som används i ett visst laboratorium. Källan till variabiliteten mellan och inom laboratorierna är (sannolikt) de olika utvecklingsstadierna i fiskpopulationen. Med tanke på variationen i VTG-mätningarna bör NOEC-värden som uteslutande bygger på denna endpoint behandlas med stor försiktighet. Det finns olika metoder för att bedöma produktionen av VTG i fiskarterna i detta test. En mätteknik som både är förhållandevis känslig och specifik är bestämningen av proteinkoncentrationer genom ELISA-metoden (enzyme-linked immunosorbent assay). Homologa antikroppar (som bildats mot VTG i samma art) och de viktigaste homologa standarderna bör användas.

Könsbestämning

52. Beroende på provtagningsmetoden för VTG placeras hela fisken eller den återstående mellersta delen av varje fisk i en behandlingskassett som märkts i förväg och fixeras i ett lämpligt fixativ för histologisk könsbestämning (eventuellt också för utvärdering av det stadium könskörtlarna befinner sig i). Riktlinjer för fixering och inbäddning finns i tillägg 7 samt i OECD:s vägledning, *Diagnosis of Endocrine-Related Histopathology of Fish Gonads* (22). Efter bearbetningen bäddas fiskarna in i paraffinblock. Enskilda individer bör placeras på längden i paraffinblocken. Minst sex längsgående preparat (3-5 μm tjocka) i frontalplanet inklusive vävnad från båda könskörtlarna tas från varje individ. Intervallet mellan dessa preparat bör vara ungefär 50 μm för hanar och 250 μm för honor. Eftersom varje block ofta innehåller både hanar och honor (om mer än en individ inbäddats i varje block), bör dock intervallet mellan preparaten från dessa block vara ungefär 50 μm tills man erhåller minst sex preparat från könskörtlarna från varje hane. Därefter kan intervallet mellan preparaten ökas till cirka 250 μm för honorna. Preparaten färgas med hematoxylin och eosin och granskas i ett ljusmikroskop med avseende på kön (hankön, honkön, intersexuellt eller odifferentierat). Intersexualitet definieras som närvaron av mer än en oocyt i testikeln per sex analyserade preparat eller spermatogena celler (ja/nej) i äggstockarna. Det är valfritt att utföra histopatologisk analys och stadiebestämning av ovarier och testiklar, men om dessa undersökningar utförs bör resultaten analyseras och redovisas statistiskt. Det bör noteras att vissa fiskarter av naturen saknar ett fullt utvecklat par könskörtlar och att endast en könskörtel kan förekomma (t.ex. japansk risfisk och ibland sebrafisk). Alla sådana observationer ska registreras.

53. Bestämning av genetiskt kön för enskilda individer av japansk risfisk bygger på förekomsten eller avsaknaden av risfiskens hanliga könsbestämmande gen, DMY, som finns på Y-kromosomen. Risfiskarnas genetiska kön kan fastställas genom att man sekvenserar DMY-genen från DNA som t.ex. extraherats från en bit av analfenan eller ryggfenan. Förekomsten av

▼M6

DMY visar på en XY-individ (hane) oavsett fenotyp, och avsaknaden av DMY visar på en XX-individ (hona) oavsett fenotyp (23). Vägledning för vävnadsberedning och PCR-metoden finns i tillägg 9. Bestämningen av det genetiska könet i enskilda storspigg utförs också med en PCR-metod som beskrivs i tillägg 10.

54. Förekomsten av intersexualitet (för definition, se tillägg 1) bör rapporteras.

Sekundära könskaraktärer

55. Sekundära könskaraktärer kontrolleras av hormoner i arter som japansk risfisk, och därför bör observationer av fiskens fysiska utseende om möjligt göras vid slutet av exponeringen. Hos japansk risfisk är den vårtliknande bildningen på bakre delen av honans analfena androgenkänslig. I kapitel C.37 i denna bilaga (38) finns relevanta fotografier av hanens sekundära könskaraktärer och av androgeniserade honor.

DATA OCH RAPPORTERING

Behandling av resultaten

56. Det är viktigt att man använder de mest kraftfulla giltiga statistiska testerna för att fastställa endpoints. Den experimentella enheten är replikatet, men variationer mellan replikaten bör ingå i den statistiska testningen. Ett flödesschema över beslutsgången finns i tillägg 8 för att hjälpa till med att finna det mest ändamålsenliga statistiska testet på grundval av egenskaperna hos de data som erhållits från testet. Den statistiska signifikansnivån är 0,05 för alla endpoints som ingår.

Könsförhållanden och genetiskt kön

57. Förhållandet mellan könen bör analyseras med avseende på signifikanta effekter (NOEC/LOEC-metoden) av exponeringen med Jonckheere-Terpstras (trendtest) om det föreligger en monoton dos-respons. Om icke-monotonicitet föreligger ska ett parvist test användas: använd Dunnetts test om det går att uppnå normalitet och homogen varians, och Tamhane-Dunnetts test om det föreligger heterogen varians. Använd i annat fall Mann-Whitneys exakta test med Bonferroni-Holm-justering. Ett flödesschema över statistiken rörande förhållandet mellan könen finns i tillägg 8. Förhållandet mellan könen bör presenteras i tabeller som koncentrationsandelar ± standardavvikelser för hanar, honor, intersexuella och odifferentierade. Den statistiska signifikansen bör lyftas fram. Exempel ges i valideringsrapporten för testet på fiskars könsutveckling fas 2 (42). Genetiskt kön bör rapporteras som en procentandel av de fenotypiska könsbytena hos hanar, honor, intersexuella och odifferentierade.

Koncentrationer av VTG

58. Koncentrationerna av VTG bör analyseras med avseende på signifikant effekt (NOEC/LOEC-metoden) av exponeringen. Det är bättre att använda Dunnetts test än t-testet med Bonferronikorrigering. Om en Bonferronikorrigering används är Bonferroni-Holm-korrigeringen att föredra. Man bör räkna med att en logaritmisk transformation av VTG måste göras för att uppnå normalitet och varianshomogenitet. Om koncentration-responsen är förenlig med monotoniciteten är Jonckheere-Terpstras test att föredra framför något av de ovanstående. Om t-tester eller Dunnetts test används finns det inget behov av ett ANOVA-signifikans F-test för att gå vidare. För

▼M6

närmare detaljer, se flödesschemat i tillägg 8. Resultaten bör rapporteras i tabeller som medelvärden av koncentrationen ± standardavvikelser för hanar, honor, intersexuella och odifferentierade var för sig. Den statistiska signifikansen för fenotypiska honor och fenotypiska hanar bör framhävas. Exempel ges i valideringsrapporten för testet på fiskars könsutveckling fas 2 (42).

Faktiska koncentrationer av testkemikalien

59. De faktiska koncentrationerna av testkemikalien i behållaren bör analyseras i frekvenser som beskrivs i punkt 34. Man bör rapportera resultaten i tabeller som medelvärdet av koncentrationen ± standardavvikelser på replikat- och koncentrationsbasis med information om antalet prover, och då markera avvikelser från den genomsnittliga behandlingskoncentrationen ± 20 %. Exempel finns att tillgå i valideringsrapporten för testet på fiskars könsutveckling fas 2 (42).

Tolkning av resultaten

60. Resultaten bör tolkas med försiktighet när de uppmätta koncentrationerna av testkemikalien i testlösningen ligger på nivåer nära analysmetodens detektionsgräns.

Testrapport

61. Testrapporten ska innehålla följande information:

Testkemikalie

— relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper, kemiska identifieringsdata inklusive renhet och analysmetod för kvantifiering av testkemikalien.

Testbetingelser

— testmetod (t.ex. genomflödestest eller semistatiskt/förnyelse), testets utformning inklusive testkoncentrationer, metoden för beredning av stamlösningar (i en bilaga), förnyelsefrekvensen (solubiliseringsmedlet och dess koncentration bör anges i förekommande fall),

— nominella testkoncentrationer, de uppmätta värdenas medelvärden och deras standardavvikelser i testkärlen samt den metod med vilken dessa erhölls (den analysmetod som används bör presenteras i en bilaga) och bevis för att mätningarna hänför sig till testkemikaliens koncentrationer i en äkta lösning,

— vattenkvaliteten i testbehållarna: pH, hårdhet, temperatur och halten löst syre,

— detaljerade uppgifter om utfodringen (t.ex. typ av foder, källa, hur mycket fiskarna har fått och hur ofta samt analys av förorenande ämnen (t.ex. PCB, polycykliska aromatiska kolväten och bekämpningsmedel som innehåller organiska klorföreningar) i tillämpliga fall.

Resultat

— belägg för att kontrollerna uppfyller giltighetskriterierna: uppgifter om andelen kläckta djur bör presenteras i tabeller som en procentandel per replikat och per koncentration. Avvikelser från kriterierna för godkännande (i kontrollerna) bör lyftas fram. Överlevnaden bör presenteras som en procentandel per replikat och per koncentration. Avvikande mätvärden från giltighetskriterierna (i kontrollerna) bör lyftas fram,

— en klar indikering av de erhållna resultaten för de olika endpoints som observerats: embryonas överlevnad och kläckningsframgång, externa abnormiteter, längd och vikt, mätvärden för VTG (ng/g homogenat,

▼M6

ng/ml plasma eller ng/mg lever), histologisk undersökning av könskörtlarna, könsfördelning, uppgifter om genetiskt kön, förekomst av alla ovanliga reaktioner hos fisken och alla synbara effekter av testkemikalien.

62. Resultaten bör presenteras som medelvärden ± standardavvikelse eller standardfel. Statistiken ska rapporteras åtminstone som LOEC och NOEC samt konfidensintervall. Man bör följa det statistiska flödesschemat (tillägg 8).

LITTERATUR

(1) OECD (1992), *Fish, Early Life Stage Toxicity Test,* Test Guideline No. 210, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris.

(2) Jobling, S., D. Sheahan, J. A. Osborne, P. Matthiessen och 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) Sumpter, J. P. och S. Jobling, 1995, ”Vitellogenesis As A Biomarker for Estrogenic Contamination of the Aquatic Environment”, Environmental Health Perspectives 103, s. 173–178.

(4) Tyler, C. R., R.van Aerle, T. H. Hutchinson, S. Maddix och 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) Holbech, H., L. Andersen, G. I. Petersen, B. Korsgaard, K. L. Pedersen och 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) Andersen, L., P. Bjerregaard och 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) Orn, S., H. Holbech, T. H. Madsen, L. Norrgren och 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) Panter, G. H., T. H. Hutchinson, R. Lange, C. M. Lye, J. P. Sumpter, M. Zerulla och 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) Sun, L. W., J. M. Zha, P. A. Spear och 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) Parks, L. G., A. O. Cheek, N. D. Denslow, S. A. Heppell, J. A. McLachlan, G. A. LeBlanc och 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) Brion, F., B. M. Nilsen, J. K. Eidem, A. Goksoyr och 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) Nishi, K., M. Chikae, Y. Hatano, H. Mizukami, M. Yamashita, R. Sakakibara och 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) Hahlbeck, E., I. Katsiadaki, I. Mayer, M. Adolfsson-Erici, J. James och 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) Tatarazako, N., M. Koshio, H. Hori, M. Morita och 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) Eidem, J. K., H. Kleivdal, K. Kroll, N. Denslow, R. van Aerle, C. Tyler, G. Panter, T. Hutchinson och 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) Jensen, K. M. och 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) Holbech, H., Petersen, G. I., Norman, A., Örn, S, Norrgren, L. och Bjerregaard, P (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*)", Nordiska ministerrådet, TemaNord 2001:597, s. 48–51.

(18) Nilsen, B. M., K. Berg, J. K. Eidem, S. I. Kristiansen, F. Brion, J. M. Porcher och 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) Orn, S., S. Yamani och 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) Scholz, S. och N. Kluver (2009), "Effects of Endocrine Disrupters on Sexual, Gonadal Development in Fish", Sexual Development 3, s. 136–151.

(21) Fenske, M., G. Maack, C. Schafers och 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) Kobayashi, T., M. Matsuda, H. Kajiura-Kobayashi, A. Suzuki, N. Saito, M. Nakamoto, N. Shibata, och 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) Shinomiya, A., H. Otake, K. Togashi, S. Hamaguchi och 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) Kidd, K. A., P. J. Blanchfield, K. H. Mills, V. P. Palace, R. E. Evans, J. M. Lazorchak och 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) Palace,V. P., R. E. Evans, K. G. Wautier, K. H. Mills, P. J. Blanchfield, B. J. Park, C. L. Baron och 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) Panter, G. H., T. H. Hutchinson, K. S. Hurd, J. Bamforth, R. D. Stanley, S. Duffell, A. Hargreaves, S. Gimeno och 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) Holbech, H., K. Kinnberg, G. I. Petersen, P. Jackson, K. Hylland, L. Norrgren och 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) Andersen, L., K. Kinnberg, H. Holbech, B. Korsgaard och 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) Morthorst, J. E., H. Holbech och P. Bjerregaard (2010), ”Trenbolone causes irreversible masculinization of zebrafish at environmentally relevant concentrations”, Aquatic Toxicology 98, s. 336–343.

(31) Kiparissis,Y., T. L. Metcalfe, G. C. Balch och 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) Panter, G. H., T. H. Hutchinson, K. S. Hurd, A. Sherren, R. D. Stanley och 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) Kinnberg, K., H. Holbech, G. I. Petersen och 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 denna bilaga, Tillväxttest på unga exemplar av fisk.

(35) Kapitel C.4 i denna bilaga, Lätt bionedbrytbarhet.

(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 denna bilaga, 21-dagars test på fisk: En kortsiktig screening för ämnen med östrogen och androgen aktivitet samt aromatashämmande verkan.

(39) OECD (2012), Fish Toxicity Testing Framework, Series on Testing and Assessment No. 171, OECD, Paris

(40) Schäfers, C., Teigeler, M., Wenzel, A., Maack, G., Fenske, M., Segner, H (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 – Del 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) Europaparlamentets och rådets direktiv 2010/63/EU av den 22 september 2010 om skydd av djur som används för vetenskapliga ändamål. EUT L 276, 20.10.2010, s. 33.

▼M6

Tillägg 1

Förkortningar och definitioner

Apikal endpoint: orsakar effekter på populationsnivå

Luftmättnadsvärde (ASV): luftmättnadsvärdet

Biomarkör: orsakar effekter på individnivå

Kemikalie: ett ämne eller en blandning

Dph, days post hatch: dagar efter kläckningen

DMY: Y-länkad DM-domängen som krävs för den hanliga utvecklingen i risfiskar

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

Fiskvikt: fiskens våtvikt (avtorkad)

FSDT: Test på fiskars könsutveckling

HPG-axeln: stressaxeln, bestående av hypotalamus, hypofysen och binjurebarken

Intersexuella fiskar: fiskar med mer än en oocyt i testikeln per sex analyserade preparat eller spermatogena celler i äggstockarna (ja/nej)

Fisktäthet: våtvikten fisk per vattenvolym

MOA: verkningssätt

RT-PCR: PCR med omvänd transkription

Testkemikalie: alla ämnen eller blandningar som testas med denna testmetod

Odifferentierad fisk: fisk med könskörtlar som inte har några märkbara könsceller

VTG: vitellogenin

▼**M6**

Tillägg 2

Försöksbetingelser för testet på fiskars könsutveckling (sötvattensarter)

1. Rekommenderade arter	Japansk risfisk (*Oryzias latipes*)	Sebrafisk (*Danio rerio*)	Storspigg (*Gasterosteus aculeatus*)
2. Testtyp	Genomflödestest eller semistatiskt test	Genomflödestest eller semistatiskt test	Genomflödestest eller semistatiskt test
3. Vattentemperatur	25 ± 2 °C	27 ± 2 °C	20 ± 2 °C
4. Belysningskvalitet	Fluorescerande lampor (brett spektrum)	Fluorescerande lampor (brett spektrum)	Fluorescerande lampor (brett spektrum)
5. Ljusintensitet	10–20 µE/m^2/s, 540–1 080 lux, eller 50–100 ft-c (omgivande ljusnivåer i laboratoriet)	10–20 µE/m^2/s, 540–1 080 lux, eller 50–100 ft-c (omgivande ljusnivåer i laboratoriet)	10–20 µE/m^2/s, 540–1 080 lux, eller 50–100 ft-c (omgivande ljusnivåer i laboratoriet)
6. Fotoperiod	12–16 timmar ljus, 8–12 timmar mörker	12–16 timmar ljus, 8–12 timmar mörker	16 timmar ljus, 8 timmar mörker
7. Behållarens minsta storlek	Enskilda behållare bör innehålla minst 7 liter vatten	Enskilda behållare bör innehålla minst 7 liter vatten	Enskilda behållare bör innehålla minst 7 liter vatten
8. Volymutbyte av testlösningar	Minst fem per dag	Minst fem per dag	Minst fem per dag
9. Testorganismernas ålder i början av exponeringen	Nyligen befruktade ägg (tidigt blastulastadium)	Nyligen befruktade ägg (tidigt blastulastadium)	Nyligen befruktade ägg
10. Antal ägg per testkärl	Minst 120	Minst 120	Minst 120
11. Antal testkärl	Minst tre (plus lämpliga kontroller)	Minst tre (plus lämpliga kontroller)	Minst tre (plus lämpliga kontroller)
12. Antal replikat per testkärl	Minst fyra (om man inte använder kvadratrotsfördelning till kontrollerna)	Minst fyra (om man inte använder kvadratrotsfördelning till kontrollerna)	Minst fyra (om man inte använder kvadratrotsfördelning till kontrollerna)
13. Utfodring	Levande *Artemia*, frysta vuxna saltkräftor, flingfoder, etc. Det rekommenderas att man utfodrar två gånger dagligen	Särskilt yngelfoder, levande *Artemia*, frysta vuxna saltkräftor, flingfoder, etc. Det rekommenderas att man utfodrar två gånger dagligen	Levande *Artemia*, frysta vuxna saltkräftor, flingfoder, etc. Det rekommenderas att man utfodrar två gånger dagligen
14. Luftning	Ingen såvida inte koncentrationen av löst syre sjunker under 60 % mättnad	Ingen såvida inte koncentrationen av löst syre sjunker under 60 % mättnad	Ingen såvida inte koncentrationen av löst syre sjunker under 70 % mättnad

▼M6

15. Utspädningsvatten	Rent yt- eller brunnsvatten eller rekonstituerat vatten	Rent yt- eller brunnsvatten eller rekonstituerat vatten	Rent yt- eller brunnsvatten eller rekonstituerat vatten
16. Den kemiska exponeringens varaktighet	60 dagar efter kläckningen	60 dagar efter kläckningen	60 dagar efter kläckningen
17. Biologiska endpoints	Kläckningsframgång, överlevnad, makromorfologi, VTG könskörtlarnas histologi, genetiskt kön könsfördelning	Kläckningsframgång, överlevnad makromorfologi, VTG könskörtlarnas histologi, könsfördelning	Kläckningsframgång, överlevnad makromorfologi, VTG könskörtlarnas histologi, könsfördelning
18. Testets godtagbarhetskriterier för sammanlagda kontrollreplikat	Kläckningsframgång > 80 %	Kläckningsframgång > 80 %	Kläckningsframgång > 80 %
	Överlevnad efter kläckningen ≥ 70 %	Överlevnad efter kläckningen ≥ 70 %	Överlevnad efter kläckningen ≥ 70 %
	Tillväxt (den avtorkade fiskens våtvikt) > 150 mg	Tillväxt (den avtorkade fiskens våtvikt) > 75 mg	Tillväxt (den avtorkade fiskens våtvikt) > 120 mg
	Längd (normallängd) > 20 mm	Längd (normallängd) > 14 mm	Längd (normallängd) > 20 mm
	Könsfördelning (% hanar och honor) 30–70 %	Könsfördelning (% hanar och honor) 30–70 %	Könsfördelning (% hanar och honor) 30–70 %

▼**M6**

Tillägg 3

Ett godtagbart utspädningsvattens kemiska egenskaper

BESTÅNDSDEL	KONCENTRATION
Partiklar	< 20 mg/l
Halt av organiskt kol	< 2 mg/l
Ojoniserad ammoniak	< 1 µg/l
Resterande mängd klor	< 10 µg/l
Total mängd bekämpningsmedel som innehåller organiska fosforföreningar	< 50 ng/l
Total mängd bekämpningsmedel som innehåller organiska klorföreningar plus polyklorerade bifenyler	< 50 ng/l
Total mängd organiskt klor	< 25 ng/l

▼M6

Tillägg 4

Från testmetod c.14 /Vägledning om testkoncentrationer

Kolumn (antal koncentrationer mellan 100 och 10 eller mellan 10 och 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 serie med tre (eller flera) på varandra följande koncentrationer kan väljas ur en kolumn. Mittpunkterna mellan koncentrationerna i kolumn (x) finns i kolumn (2x + 1). De angivna värdena kan representera koncentrationer uttryckta som procenthalt per volym eller vikt (mg/l eller µg/l). Värdena kan multipliceras eller divideras med en eller flera tiopotenser, beroende på vad som är lämpligt. Kolumn 1 kan användas om det råder betydande osäkerhet om toxicitetsnivån.

▼M6

Tillägg 5

Vägledning för homogenisering av huvud och stjärt från unga exemplar av sebrafisk, knölskallelöja, storspigg och japansk risfisk

Syftet med detta avsnitt är att beskriva de förfaranden som föregår bestämningen av VTG-koncentrationen. Andra förfaranden som leder till en jämförbar bestämning av VTG kan också användas. Alternativt kan man fastställa VTG-koncentrationen i blodplasma eller lever i stället för i huvud/stjärthomogenat.

Förfarande

1. Fiskarna bedövas eller avlivas i enlighet med testbeskrivningen.

2. Huvudet och stjärten skärs av i enlighet med testbeskrivningen. **Obs**! Alla dissektionsinstrument och skärbrädan bör sköljas och rengöras ordentligt (t.ex. med 96 % etanol) mellan hanteringen av varje enskild fisk att förhindra ”VTG-förorening” från honor eller inducerade hanar till oinducerade hanar.

3. Den sammanlagda vikten av huvud och stjärt från varje fisk mäts till närmaste mg.

4. Efter vägning placeras delarna i lämpliga rör (t.ex. 1,5 ml eppendorfrör) och fryses vid – 80 °C tills homogeniseringen, eller homogeniseras direkt på is med två mortelstötar av plast. (Andra metoder kan användas om de utförs på is och resultatet är en homogen massa). **Obs**! *Rören ska numreras noggrant så att fiskarnas huvud och stjärt kan hänföras till deras respektive kroppar, som används för histologisk undersökning av könskörtlarna*.

5. När en homogen massa erhållits tillsätts iskall homogeniseringsbuffertlösning (*) med en mängd på 4–10 gånger vävnadens vikt (lägg märke till utspädningen). Fortsätt att arbeta med mortelstötarna tills blandningen är homogen. **Viktig anmärkning**: *Nya mortelstötar används för varje fisk.*

6. Proven läggs på is tills centrifugeringen vid **4 °C** och 50 000 g i 30 minuter.

7. Använd en pipett för att dosera ut portioner på 20–50 µl (lägg märke till mängden) supernatant i **minst två** rör genom att doppa pipettens spets under fettlagret på ytan och försiktigt suga upp supernatanten utan att få med fragment av fett eller små bitar.

8. Rören förvaras vid – 80 °C fram till användningen.

(*) *Buffertlösning för homogenisering:*

50 mM Tris-HCl pH 7,4; 1 % proteashämmarblandning (Sigma): 12 ml Tris-HCl pH 7,4 + 120 µl proteashämmarblandning (eller liknande proteashämmarblandningar).

TRIS: TRIS-ULTRA PURE (ICN)

Proteashämmarblandning: Från Sigma (för däggdjursvävnader) produkt nr **P 8340**.

Anmärkning: Buffertlösningen för homogenisering bör användas samma dag som den beretts. Lägg den på is under användningen.

▼M6

Tillägg 6

Vägledning för beräkning av vitellogenin för huvud/stjärthomogenat av sebrafisk (*Danio rerio*) (modifierat från Holbech m.fl., 2001). Andra förfaranden som använder homologa antikroppar och standarder kan användas

1. Mikrotiterplattor (certifierade Maxisorp F96, Nunc, Roskilde Danmark) som i förväg belagts med 5 µg/ml anti-sebrafisk lipovitellin-IgG tinas upp och tvättas tre gånger med en tvättbuffert (*).

2. Renad sebrafisk-vitellogenin-standardlösning ([1]) späds ut i omgångar till 0,2, 0,5, 1, 2, 5, 10 och 20 ng/ml i en utspädningsbuffert (**), och proven späds ut minst 200 gånger (för att förhindra matriseffekter) i en utspädningsbuffert och appliceras på plattorna. En testkontroll appliceras i två exemplar. 150 µl tillsätts i varje brunn. Standarderna appliceras i två exemplar och proverna i tre exemplar. Inkubera över natten vid 4 °C i en skakapparat.

3. Plattorna tvättas fem gånger med en tvättbuffert (*)

4. HRP bunden till en dextrankedja (t.ex. AMDEX A/S, Danmark) och konjugerade antikroppar späds i en tvättbuffert. Den faktiska utspädningen varierar beroende på parti och ålder. 150 µl tillsätts i varje brunn och plattorna inkuberas i en timme i rumstemperatur i en skakapparat.

5. Plattorna tvättas fem gånger med tvättbuffert (*) och plattornas botten rengörs noggrant med etanol.

6. 150 µl TMB plus (***) tillsätts i varje brunn. Skydda plattan mot ljus med aluminiumfolie, och observera färgutvecklingen i en skakapparat.

7. När standardkurvan är fullt utvecklad hejdas enzymaktiviteten genom tillsats av 150 µl 0,2 M H_2SO_4 i varje brunn.

8. Absorbansen mäts vid 450 nm (t.ex. med en Molecular Devices Thermomax läsare för mikrotiterplattor). Erhållna data analyseras med lämplig programvara (t.ex. Softmax).

(*) Tvättbuffert:

PBS-stamlösning (****)	500,0	ml
BSA	5,0	g
Tween 20	5,0	ml

Justera pH till 7,3 och fyll upp till 5 l med Millipore H_2O. Förvara vid 4 °C.

(**) Utspädningsbuffert:

PBS-stamlösning (****)	100,0	ml
BSA	3,0	g
Tween 20	1,0	ml

Justera pH till 7,3 och fyll upp till 1 l med Millipore H_2O. Förvara vid 4 °C.

(***) TMB plus är ett ”bruksfärdigt” substrat framställt av KemEnTec (Danmark). Det är ljuskänsligt. Förvara vid 4 °C.

([1]) Battelle AP4.6.04 (1,18 mg/ml (AAA)), renad enligt Denslow, N. D., Chow, M. C., Kroll, K. J., Green, L. (1999). Vitellogenin som biomarkör för exponering för östrogen eller östrogenimiterande ämnen. Ecotoxicology 8: 385–398.

▼**M6**

(****) PBS-stamlösning

NaCl	160,0	g
KH_2PO_4	4,0	g
$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	26,6	g
KCl	4,0	g

Justera pH till 6,8 och fyll upp till 2 l med Millipore H_2O. Förvara vid rumstemperatur.

▼M6

Tillägg 7

Vägledning för beredning av vävnadspreparat för könsbestämning och stadiebestämning av könskörtlar

Syftet med detta avsnitt är att beskriva de förfaranden som föregår utvärderingen av histologiska preparat. Andra förfaranden som leder liknande resultat för könsbestämningen och stadiebestämningen av könskörtlarna kan också användas.

Med några få undantag är dessa förfaranden är likartade för japansk risfisk (JMD) och sebrafisk (ZF).

Avlivning, obduktion och fixering av vävnader

Mål:

1. Sörja för human avlivning av fisk.

2. Erhålla nödvändiga data rörande kroppsvikt och kroppsmätningar.

3. Utvärdera sekundära könskaraktärer.

4. Dissekera vävnader för VTG-analys.

5. Fixering av könskörtlarna.

Förfaranden:

1. Fiskarna bör avlivas omedelbart innan obduktionen. Om det inte står flera prosektorer till förfogande bör därför inte flera fiskar avlivas samtidigt.

2. Med hjälp av en liten håv avlägsnas fisken från testbehållaren och förs till obduktionsplatsen i transportbehållaren.

3. Fisken släpps ut i avlivningslösningen. Fisken avlägsnas från lösningen när andningen upphör och fisken inte reagerar på extern retning.

4. Fiskens våtvikt fastställs.

5. För beredning av vävnader för VTG-analys kan fisken kan placeras på en korkplatta på objektbordet i ett dissektionsmikroskop.

   a. För sebrafisk skärs huvudet av rakt bakom bröstfenan och stjärten skärs av rakt bakom ryggfenan.

   b. För japansk risfisk öppnas buken genom ett försiktigt gjort snitt som sträcker sig längs den ventrala mittlinjen från skuldergördeln till en punkt som ligger precis kranialt från anus. Med hjälp av en liten pincett och en liten sax avlägsnas levern försiktigt.

6. Prov för VTG-analys placeras i eppendorfrör och fryses omedelbart i flytande kväve.

7. Kroppen, inklusive könskörtlar, placeras i en på förhand märkt vävnadskassett av plast som överförs till Davidsons eller Bouins fixativ. Fixativets volym ska vara minst tio gånger den uppskattade vävnadsvolymen. Fixeringsbehållaren omskakas varsamt i fem sekunder för att lösgöra luftbubblor från kassetten.

8. a. Alla vävnader blir kvar i Davidsons fixativ över natten, och överförs sedan till separata behållare med 10 % neutral buffrad formalin följande dag. Behållare med kassetter omskakas varsamt i fem sekunder för att säkerställa tillräcklig infiltrering av formalinet i kassetterna.

▼M6

b. Vävnaderna blir kvar i Bouins fixativ i 24 timmar och överförs därefter till 70 % etanol.

Bearbetning av vävnader

Mål:

1. Torka ut vävnaden för tillräcklig infiltrering av paraffin.

2. Impregnera vävnaden med paraffin för att bevara vävnadsintegriteten och skapa en fast yta för mikrotomi.

Förfaranden:

3. Märkta vävnadskassetter avlägsnas från lagringen i formalin/etanol och kassetterna placeras i beredningskorgarna. Beredningskorgen fylls i vävnadsberedaren.

4. Tidsplanen för beredningen väljs ut.

5. Efter det att vävnadsberedaren har slutfört behandlingscykeln kan korgarna överföras till inbäddningsstationen.

Inbäddning

Mål:

Att korrekt justera provexemplarets position i stelnat paraffin för mikrotomi.

Förfaranden:

1. Korgen med kassetter avlägsnas från beredaren och sänks ned i den paraffinfyllda främre behållaren i inbäddningsstationens värmekonsol, eller så flyttas kassetterna till en separat paraffinvärmare.

2. Den första kassetten som ska bäddas in avlägsnas från den främre behållaren i inbäddningsstationens värmekonsol eller från paraffinvärmaren. Kassettens lock avlägsnas och kasseras, och kassettens etikett kontrolleras mot djurregistret för att lösa eventuella problem med avvikelser innan inbäddningen.

3. En lagom stor inbäddningsform väljs ut.

4. Formen hålls under fördelningskonsolens påfyllningspip och fylls med flytande paraffin.

5. Provexemplaret avlägsnas från kassetten och placeras i det flytande paraffinet i formen. Detta ska upprepas med 4–8 exemplar för varje paraffinform. De enskilda fiskarnas position markeras genom att fisk nr 1 placeras 180 grader mot fisk nr 2–4/8.

6. Ytterligare paraffin tillsätts för att täcka provexemplaret.

7. Formen och kassettens underdel placeras på kylplattan i kryokonsolen.

8. Efter att paraffinet har stelnat avlägsnas blocket (dvs. det stelnade paraffinet innehållande vävnaderna och kassettens underdel) från formen.

Mikrotomi

Mål:

Skära ut och montera histologiska preparat för färgning.

Förfaranden:

1. Den inledande fasen av mikrotomin, som går under benämningen ”skiktning”, utförs enligt följande:

   a. Paraffinblocket placeras i mikrotomens fastspänningschuck.

   b. Chucken förs framåt genom att mikrotomhjulet roteras, och tjocka preparat skärs ut från paraffinblockets yta tills kniven når de inbäddade vävnaderna.

▼M6

c. Mikrotomens preparattjocklek ställs in på mellan 3–5 mikrometer. Chucken förs framåt och flera preparat skärs ut från blocket för att avlägsna alla artefakter som skapats på vävnadens snittyta under grovputsningen.

d. Blocket kan avlägsnas från chucken och placeras på is med framsidan nedåt för att blöta ur vävnaden.

2. Nästa fas av mikrotomin är den slutliga uppdelningen och monteringen av vävnadspreparaten på objektglasen. Dessa förfaranden genomförs på följande sätt:

a. Om blocket har lagts på is avlägsnas det från isen och sätts återigen fast i mikrotomens chuck.

b. Med mikrotomens preparattjocklek inställd på 3–5 mikrometer förs chucken framåt genom att mikrotomhjulet roteras. Preparat skärs ut från blocket tills ett ”band” som innehåller minst ett godtagbart preparat inklusive könskörtlar har framställts. (Vid behov kan blocket avlägsnas från chucken under sektioneringen, läggas på is för att blöta ur vävnaden och återigen sättas fast i chucken.)

c. Preparaten lägges plant på vattenytan i ett vattenbad. Man ska försöka erhålla minst ett preparat som inte innehåller några veck och inte har några instängda luftbubblor.

d. Ett objektglas sänks ner under det bästa preparatet, som lyfts upp ur vattnet med hjälp av objektglaset. Denna process kallas för ”montering” av preparatet på objektglaset.

e. Tre preparat bereds för en uppsättning fiskar. Det andra och tredje preparatet tas efter intervaller på 50 mikrometer efter det första preparatet. Om fiskarna inte bäddats in med könskörtlarna på samma snittnivå ska fler preparat tas för att se till att minst sex preparat inklusive könskörtlarna erhålls från varje fisk.

f. Med en objektglasmärkpenna antecknas numret på blocket från vilket objektglaset framställdes.

g. Objektglaset placeras i en färgningsställning.

h. Blocket avlägsnas från chucken och placeras med framsidan nedåt för lagring.

Färgning, täckning av preparaten med täckglas, märkning av objektglasen

Mål:

— Färga preparaten för histopatologisk undersökning

— Permanent försegla de monterade och färgade vävnaderna.

— Permanent identifiera färgade preparat på ett sätt som möjliggör fullständig spårbarhet.

Förfaranden:

1. Färgning

a. Täckglasen lufttorkas över natten före färgningen.

b. Preparaten färgas med hematoxylin-eosin.

2. Täckning av preparaten med täckglas

a. Täckglas kan läggas på antingen manuellt eller automatiskt.

b. Ett objektglas sänks ned i xylen eller TissueClear, och överskottet av xylen/TissueClear skakas försiktigt av från glaset.

▼**M6**

c. Ca 0,1 ml monteringsmedium appliceras nära objektglasets kant mitt emot den mattslipade kanten eller på täckglaset.

d. Täckglaset vinklas i spetsig vinkel när det anbringas mot objektglaset.

3. Märkning

a. Etiketten på varje objektglas ska innehålla följande information.

i. Laboratoriets namn

ii. Art

iii. Provexemplar nr/Objektglas nr

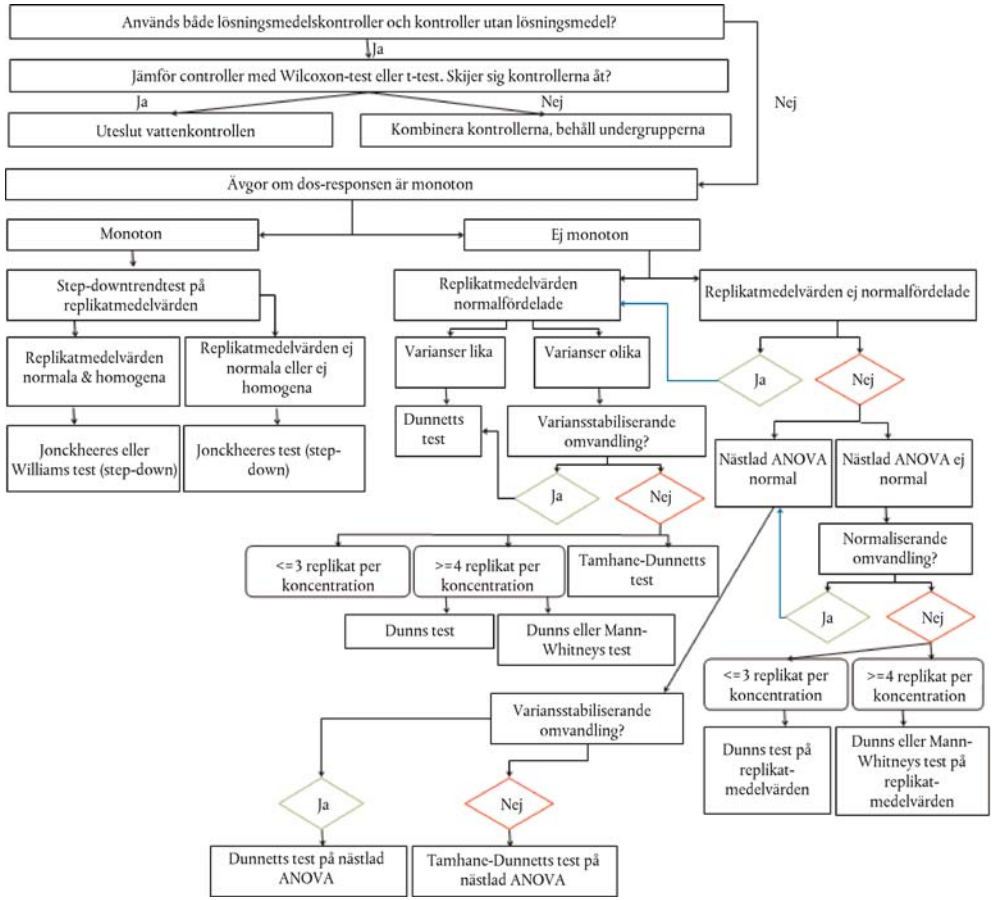
iv. Kemikalie / Behandlingsgrupp

v. Datum

▼M6

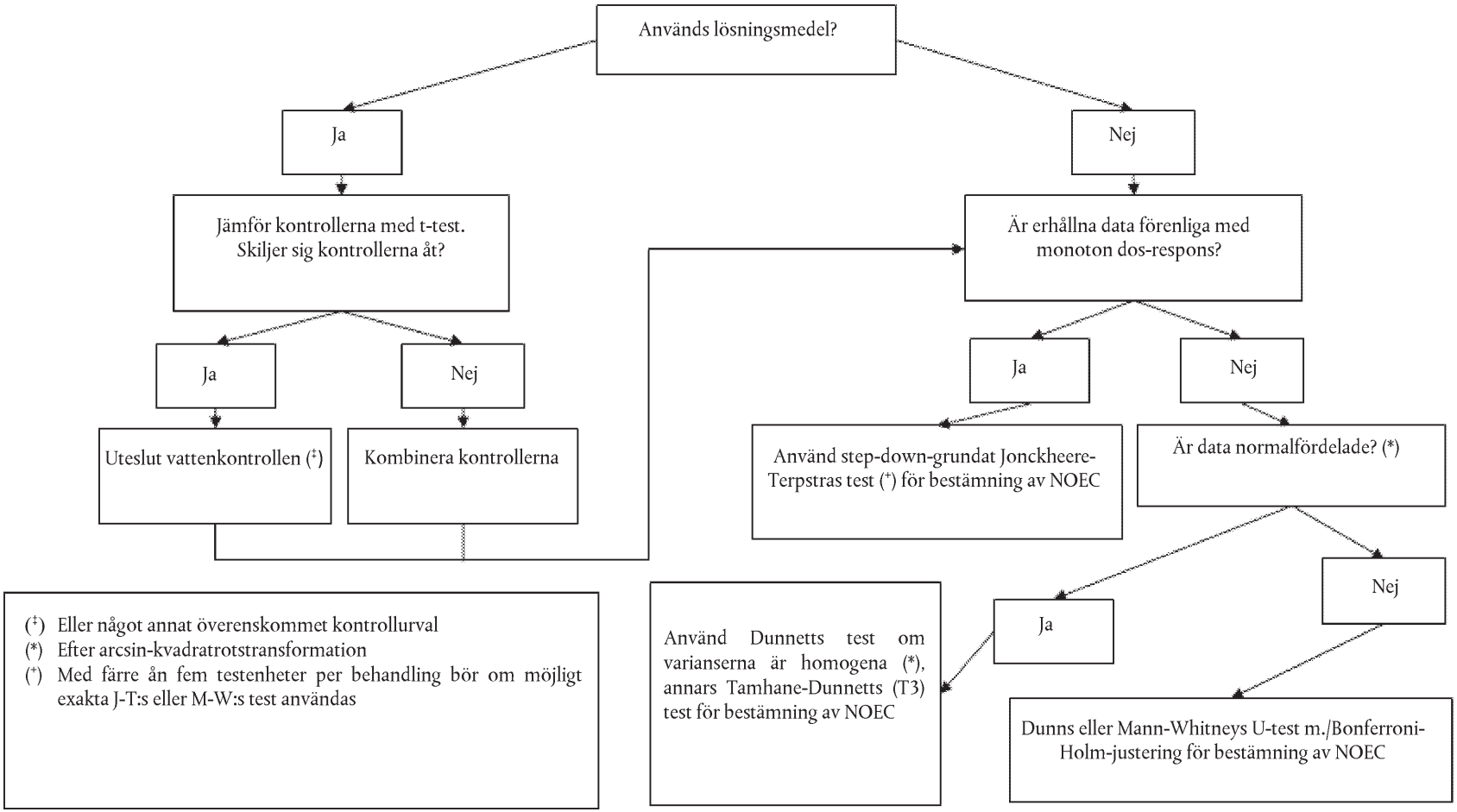
Tillägg 8

Statistiskt flödesschema för vitellogeninanalys



▼M6

Statistiskt flödesschema för analys av könsfördelningen



▼M6

Tillägg 9

Vägledning för vävnadsprovtagning för bestämning av genetiskt kön och för bestämning av genetiskt kön med PCR-metoden

Vävnadsprovtagning, beredning och lagring före bestämning av det genetiska könet hos risfiskar med PCR-metoden (utarbetad av Laboratory for Aquatic Organisms hos Bayer CropScience AG)

1. Analfenan eller ryggfenan klipps av från varje fisk med en fin sax och placeras i ett rör med 100 µl extraktionsbuffert 1 (för information om beredning av buffertlösning, se nedan). Saxen ska rengöras efter varje enskild fisk i en bägare fylld med destillerat H_2O och torkas av med ett mjukt papper.

2. Fenvävnaderna homogeniseras nu med en teflonbelagd mortelstöt för mikrorör för att uppnå lysis hos cellerna. För varje rör används en ny mortelstöt för att förhindra kontaminering. Mortelstötarna placeras över natten i 0,5 M NaOH, sköljs sedan i fem minuter i destillerat H_2O och lagras i etanol eller steriliseras efter autoklavering fram till användningen.

3. Det är också möjligt att lagra fenvävnaderna utan extraktionsbuffert 1 i torris och därefter i kylskåp vid – 80 °C för att förhindra degeneration av DNA. Extraktionen går dock lättare om man extraherar DNA samtidigt (hantering se ovan; proven ska tinas på is efter lagring vid – 80 °C innan bufferten fyllas på i rören).

4. Efter homogeniseringen placeras alla rör i vattenbad och kokas i 15 minuter vid 100 °C.

5. Sedan pipetteras 100 µl av extraktionsbuffert 2 (information om beredning av buffertlösning finns nedan) till varje provrör. Proven förvaras vid rumstemperatur i 15 minuter, och skakas ibland under tiden försiktigt för hand.

6. Därefter placeras alla rör i vattenbadet igen och kokas i ytterligare 15 minuter vid 100 °C.

7. Rören fryses vid – 20 °C och lagras för ytterligare analys.

Beredning av buffertlösning

PCR-buffert 1:

500 mg N-lauroylsarkosin (t.ex. Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland)

2 ml 5M NaCl

ad 100 ml dest. H_2O

→ autoklavera

PCR-buffert 2:

20 g Chelex (t.ex. Biorad, München, Tyskland)

Låt svälla i 100 ml dest. H_2O

→ autoklavera

Bestämning av det genetiska könet (genom PCR-metoden) hos risfiskar (utarbetad av Laboratory for Aquatic Organisms hos Bayer CropScience AG och Universität Würzburg Biozentrum)

De beredda och frysta rören (som beskrivs i avsnittet ovan) tinas på is. Efter detta centrifugeras de i en eppendorfcentrifug (30 sek. på högsta hastighet vid rumstemperatur). Den klara supernatanten som separerats från utfällningen används för PCR. Man måste absolut undvika att några spår av Chelex (lokaliserad i utfällningen) överförs till PCR-reaktionen, eftersom detta skulle påverka ”Taq”-polymerasaktiviteten. Supernatanten ska användas direkt eller kan lagras fryst (vid – 20 °C) och tinas upp igen i flera omgångar utan några negativa effekter på DNA:t för senare analyser.

▼M6

1. *Beredning av reaktionsblandning ”Reaction Mix” (25 µl per prov):*

	Volym	Slutlig koncentration
Templat-DNA	0,5 µl–2 µl	
10xPCR-buffert med $MgCl_2$	2,5 µl	1x
Nukleotider (var och en av dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	4 µl (5 mM)	200 µM
Forward primer (10µM) (se nedan 3–5)	0,5 µl	200 nM
Reverse primer (10 µM) (se nedan 3–5)	0,5 µl	200 nM
DMSO	1,25 µl	5 %
Vatten (av PCR-kvalitet)	upp till 25 µl	
Taq E-polymeras	0,3 µl	1,5 U
10xPCR-buffert med $MgCl_2$: 670 mM Tris/HCl (pH 8,8 vid 25 °C), 160 mM $(NH_4)_2SO_4$, 25 mM $MgCl_2$, 0,1 % Tween 20		

För varje PCR (se nedan 3–5) behövs den särskilda primer som utgörs av en ny kombination av ”Reaction Mix” och den lämpliga mängden templat-DNA som behövs för varje prov (se ovan). Respektive volymer överförs till nya rör med hjälp av pipetter. Därefter försluts alla rör, omröres (ca 10 sek.) och centrifugeras (10 sek. vid rumstemperatur). Nu kan respektive PCR-program påbörjas. Dessutom används en positiv kontroll (typiskt DNA-prov med känd aktivitet och tydliga resultat) och en negativ kontroll (1 µl dest. H_2O) i varje PCR-program.

2. *Beredning av agarosgel (1 %) – medan PCR-programmen pågår:*

— Lös upp 3 g agaros i 300 ml 1 × TAE-buffert (1 % agarosgel)

— Denna lösning bör kokas i en mikrovågsugn (ca 2–3 minuter)

— Överför den varma lösningen till en särskild gjutlåda, som ligger på is

— Efter ca 20 min är agarosgelen färdig för användning

— Förvara agarosgelen i 1 × TAE-buffert till dess att PCR-programmen avslutats

3. *Aktin-PCR-program:*

Denna PCR-reaktion syftar till att visa att DNA i provet inte skadas.

— Särskild primer:

”Mact1(upper/forward)” → TTC AAC AGC CCT GCC ATG TA

”Mact2(lower/reverse)” → GCA GCT CAT AGC TCT TCT CCA GGG AG

— Program:

5 min. vid 95 °C

Cykel (35 ggr):

Denaturering → 45 sek. vid 95 °C

Hybridisering → 45 sek. vid 56 °C

Elongering → 1 min. vid 68 °C

15 min. vid 68 °C

▼M6

4. *X- och Y-gen-PCR-program:*

Proven med intakt DNA används i detta PCR-program för att påvisa X- och Y-gener. Hanligt DNA bör uppvisa ett dubbelband och honligt DNA bör uppvisa ett enda band (efter färgning och gel-elektrofores). I denna programkörning bör en positiv kontroll för hanar (XY-prov) och en för honor (XX-prov) inkluderas.

— Särskild primer:

”PG 17.5” (upper/forward) → CCG GGT GCC CAA GTG CTC CCG CTG

”PG 17.6” (lower/reverse) → GAT CGT CCC TCC ACA GAG AAG AGA

— Program:

5 min. vid 95 °C

Cykel (40 ggr):

Denaturering	→ 45 sek. vid 95 °C
Hybridisering	→ 45 sek. vid 55 °C
Elongering	→ 1 min. 30 sek. vid 68 °C

15 min. vid 68 °C

5. *Y-gen-PCR-program som ”kontroll” för X- och Y-gen-PCR-programmet:*

Detta PCR-program verifierar resultatet av ”X- och Y-gen-PCR-programmet”. De hanliga proven bör uppvisa ett band och de honliga proven bör inte uppvisa något band (efter färgning och gel-elektrofores).

— Särskild primer:

”DMTYa (upper/forward)” → GGC CGG GTC CCC GGG TG

”DMTYd (lower/reverse)” → TTT GGG TGA ACT CAC ATG G

— Program:

5 min. vid 95 °C

Cykel (40 ggr):

Denaturering	→ 45 sek. vid 95 °C
Hybridisering	→ 45 sek. vid 56 °C
Elongering	→ 1 min. vid 68 °C

15 min. vid 68 °C

6. *Färgning av PCR-proven:*

Färgningslösning:

50 % glycerol

100 mM EDTA

1 % SDS

0,25 % bromfenolblått

0,25 % xylencyanol

Pipettera 1 µl av färglösningen till varje enskilt rör

7. *Påbörja gelelektroforesen:*

— Den beredda 1 % agarosgelen överförs till en gelelektrofores-kammare fylld med 1 × TAE-buffert

— 10–15 µl av varje färgat PCR-prov pipetteras till en agarosgel-brunn

— Även 5–15 µl av 1kb-”stegen” (Invitrogen) pipetteras till en separat brunn

— Inled elektroforesen med 200 V

— Avsluta efter 30–45 minuter

▼**M6**

8. *Bestämning av banden:*

— Rengör agarosgelen i destillerat H_2O

— Placera sedan agarosgelen i etidiumbromid i 15–30 minuter

— Därefter ska en bild tas av agarosgelen i en UV-ljusbox

— Slutligen analyseras proverna genom att jämföra dem med banden i den positiva kontrollen och stegen

▼M6

Tillägg 10

Riktlinjer för vävnadsprov för bestämning av genetiskt kön hos storspigg med PCR-metoden

Vävnadsprov och DNA-extraktion

DNA kan extraheras med hjälp av olika kommersiellt tillgängliga reagens och både manuella och automatiserade extraktionssystem. Det protokoll som används vid Cefas Weymouth-laboratoriet beskrivs nedan, och alternativa metoder har lagts till där så är lämpligt.

1. En liten bit vävnad (10–20 mg) från det dorsolaterala området (efter att huvudet och stjärten avlägsnats för VTG-analys), avlägsnas från varje enskild fisk med en fin sax. Vävnaden läggs i ett rör och placeras antingen direkt i flytande kväve (för lagring vid – 80 °C) eller så fylls röret med 70 % etanol (för transport och efterföljande lagring vid 4 °C). Saxen rengörs efter varje enskild fisk i 70 % etanol och därefter i destillerat vatten, och torkas sedan med mjukt papper.

2. Etanolen (i förekommande fall) avlägsnas genom aspiration och vävnaden bryts sedan ned över natten med hjälp av proteas K i 400 µl ATL-buffert (Qiagen). En alikvot (200 µl) av den nedbrutna vävnaden överförs till ett 96-brunns S-block (Qiagen), och DNA extraheras i ett 96-brunnsformat med hjälp av Qiagen BioRobot Universal System och QIAamp Investigator Bio-Robot Kit. DNA elueras i 50 µl vatten som är fritt från DNAas och RNAas. Om man använder hårda vävnader för att extrahera DNA (t.ex. en tagg eller en bröstfena) kan det bli nödvändigt att homogenisera provet i en lyseringsbuffert med hjälp av ett FastPrep®-instrument för vävnadslysering eller motsvarande vävnadsnedbrytningssystem.

   Alternativ:

   a) Vävnaden bryts ned över natten med proteas K i 400 µl G2 lyseringsbuffert (Qiagen) och DNA extraheras från 200 µl av den nedbrutna vävnaden med hjälp av antingen EZ1 DNA Tissue Kit och BioRobot EZ1 eller DNA easy tissue mini kit. DNA elueras i en volym på 50 µl.

   b) Vävnaderna bearbetas med hjälp av DNAzol-reagenset. Vävnadsproven lyseras i 1 ml DNAzol i 10 minuter i ett 1,5 ml mikrocentrifugrör och centrifugeras därefter vid 13 000 rpm i 5 minuter för att avlägsna alla partiklar. Det lyserade provet överförs sedan till ett nytt 1,5 ml mikrocentrifugrör som innehåller 500 µl 100 % etanol av molekylärbiologisk kvalitet, och centrifugeras därefter vid 13 000 rpm i 10 minuter för att fälla ut DNA. Etanolen avlägsnas och ersätts med 400 µl 70 % etanol av molekylärbiologisk kvalitet som centrifugeras vid 13 000 rpm i 5 minuter, och DNA-pelleten löses upp i 50 µl molekylärt vatten som är fritt från DNAas och RNAas. Återigen kan det bli nödvändigt, om man använder sig av hårda vävnader (bröstfena), att homogenisera provet i en lyseringsbuffert med hjälp av ett FastPrep®-instrument för vävnadslysering eller motsvarande vävnadsnedbrytningssystem innan DNA extraheras.

3. DNA förvaras vid – 20 °C fram till användning.

Obs! Handskar måste användas under dessa förfaranden.

Analys genom polymeraskedjereaktion (PCR)

Amplifieringar genomförs med 2,5 µl av DNA-extraktet i en reaktionsvolym på 50 µl med hjälp av primers för genlocus ldh (enligt beskrivning av Peichel m.fl., 2004. Current Biology 1, 1416–1424):

Forward primer	5' GGG ACG AGC AAG ATT TAT TGG 3'
Reverse Primer	5' TAT AGT TAG CCA GGA GAT GG 3'

▼M6

Det finns många leverantörer av lämpliga PCR-reagens. Den metod som beskrivs nedan är den som för närvarande används vid Cefas Weymouth-laboratoriet.

1. *Beredning av reaktionsblandning ”Reaction Mix” (50 µl per prov):*

En masterblandning bereds på det sätt som beskrivs här. Den kan beredas i förväg och lagras fryst vid – 20 °C fram till användning. Bered tillräckligt med masterblandning för en negativ kontroll (endast vatten av molekylärbiologisk kvalitet).

	Volym (stamlösnings-konc.)/prov	Slutlig koncentration
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 vardera)	250 µM vardera
Forward primer	0,5 µl (0,1 nmol/µl)	2,0 µM
Reverse primer	0,5 µl (0,1 nmol/µl)	2,0 µM
Vatten av molekylärbiologisk kvalitet	30,75 µl	
GoTaq-polymeras	0,25 µl	1,25 U

— Mät upp 47,5 µl i ett etiketterat 0,5 ml tunnväggigt PCR-rör.

— Tillsätt 2,5 µl renat DNA till röret med lämplig etikett. Upprepa för alla prover och den negativa kontrollen.

— Täck med 2 droppar mineralolja. Alternativt kan man använda en termocykler med uppvärmt lock.

— Stäng locken.

— Proven denatureras i en Peltier PTC-225 termocykler vid 94 ± 2 °C i 5 minuter följt av 39 cykler vid 94 ± 2 °C i 1 minut, 55 ± 2 °C i 1 minut, 72 ± 2 °C i 1 minut, och en avslutande förlängning vid 72 ± 2 °C i 10 minuter.

2. *Beredning av agarosgelen (2 %):*

Vanligtvis löses PCR-produkterna upp på 20 % agarosgel som innehåller etidiumbromid.

Kapillärbaserade elektroforessystem kan också användas.

— Väg upp 2 g agaros i 100 ml 1 × TAE-buffert.

— Värm i mikrovågsugn (ca 2–3 minuter) för att lösa upp agarosen.

— Tillsätt 2 droppar etidiumbromid, slutkoncentration 0,5 µg/ml.

— Överför den varma lösningen till gelgjutningsutrustningen.

— Låt gelen stelna.

3. *Gelelektrofores:*

— Överför agarosgelen till elektroforesutrustningen och sänk ner den i 1 × TAE-buffert.

— Ladda 20 µl av varje prov i en separat brunn och lägg till en molekylviktsmarkör (100 bp DNA-stege, Promega) i en tom brunn.

— Elektroforesen utförs vid 120 V i 30–45 minuter.

▼**M6**

4. *Visualisering av amplifieringsprodukterna*

Om etidiumbromiden tillsattes till agarosgelen enligt beskrivning ovan kan DNA-produkterna visualiseras under en ultraviolett ljuskälla. Alternativt kan agarosgelen färgas genom att gelen täcks med en lösning av upplöst etidiumbromid (0,5 μg/ml i vatten) i 30 minuter innan visualiseringen.

▼M6

Tillägg 11

Vägledning för konstgjord befruktning av storspigg

Syftet med detta avsnitt är att beskriva de förfaranden som används för att erhålla befruktade ägg från storspigg i syfte att använda dem i testet på fiskars könsutveckling.

Förfaranden

Insamling av sperma från hanar

1. En välfärgad hane från den önskade populationen avlivas.

2. Testiklarna avlägsnas från båda sidorna av fisken. *Testiklarna är i allmänhet starkt pigmenterade, stavformiga strukturer som är lätta att urskilja vid kroppens laterala mittlinje.* Använd någon av följande metoder:

3. Med hjälp av en fin sax gör man med början vid kloaken ett 1–1,5 cm långt vinklat snitt (45 grader) med ett enda klipp.

4. Använd en skalpell för att göra ett litet snitt i sidan på fisken något framför bäckenet och precis ventralt från de laterala benplattorna.

5. Testiklarna avlägsnas med hjälp av en liten pincett och placeras i en petriskål.

6. Varje testikel täcks med 100 µl nyberedd **Hanks lösning** (*).

7. Testiklarna skärs i små tärningar med ett rakblad eller en skalpell. Detta kommer att frigöra sperman och ger Hanks lösning ett mjölkvitt utseende.

8. Vätskan som innehåller sperman samlas upp i ett provrör. Försök undvika att få med bitar av testikelvävnad vid pipetteringen.

9. 800 µl Hanks lösning tillsätts i röret och blandas väl.

10. Om så krävs kan hanen bevaras genom att fixeras i 100 % etanol eller annat utvalt fixativ. Detta är särskilt viktigt om man i undersökningen bestämmer avkommans föräldraursprung.

Viktig anmärkning: *Även om de flesta stamlösningar som behövs kan göras i förväg bör* ***stamlösning 5*** *och därefter* ***Hanks lösning nyberedas*** *samma dag som de används.*

Stamlösning 1	
NaCl	8,00 g
KCl	0,40 g
Destillerat vatten	100 ml
Stamlösning 2	
Na_2HPO_4 (vattenfri)	0,358 g
KH_2PO_4	0,60 g
Destillerat vatten	100 ml
Stamlösning 3	
$CaCl_2$	0,72 g
Destillerat vatten	50 ml

(*) Hanks buffrade saltlösning(HBSS):

HBSS behövs för att bevara sperman medan man förbereder befruktningen.

▼M6

Stamlösning 4

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1,23 g
Destillerat vatten	50 ml

Stamlösning 5 (nyberedd)

$NaHCO_3$	0,35 g
Destillerat vatten	10 ml

Anmärkning: Om man redan har en del av ovanstående salter men med en annan vattenhalt (dvs. $2H_2O$ i stället för vattenfri) kan dessa ändå användas, men vikten måste först justeras på grundval av molekylvikten.

För Hanks lösning kombineras i följande ordning

stamlösning 1	1,0 ml
stamlösning 2	0,1 ml
stamlösning 3	0,1 ml
destillerat vatten	8,6 ml
stamlösning 4	0,1 ml
stamlösning 5	0,1 ml

Blanda väl före användning.

Befruktning

1. Stora lekmogna honor med ägg väljs ut från den önskade populationen. Honorna är färdiga att kramas ur först när man kan se äggen sticka fram i kloaken. Honor som är lekmogna har en karaktäristisk kroppsställning med huvudet uppåt.

2. För försiktigt ett finger eller tummen längs sidan av fisken mot stjärten för att uppmuntra till utstötning av en äggsäck i en ny petriskål. Upprepa på andra sidan och släpp tillbaka fisken i dess akvarium.

3. Äggen kan spridas ut (till ett enskiktslager) med en liten pensel. Det är viktigt att försöka exponera så många ägg som möjligt för sperman, så det är till stor hjälp om man maximerar äggskiktets ytareal. Viktig anmärkning: Håll äggen fuktiga genom att täcka dem runt om med fuktigt mjukt papper (det är viktigt att äggen inte kommer i direkt beröring med vatten eftersom detta kan göra att korion hårdnar i förtid och därmed förhindrar befruktningen). Antalet ägg som varje hona kan producera varierar kraftigt, men i genomsnitt bör man enkelt kunna erhålla cirka 150 ägg från en enda lekmogen hona.

4. 25µl sperma i Hanks blandning fördelas jämnt över äggskiktets hela yta med hjälp av penseln. Äggen kommer snabbt att hårdna och ändra färg (inom en minut) när befruktningen har inletts. Upprepa förfarandet om det uppskattade antalet ägg är mer än 150. Likaledes ska man tillsätta lite mer sperma om äggen inte hårdnar inom en minut. Viktig anmärkning: Att tillsätta mer sperma ökar inte nödvändigtvis befruktningsfrekvensen.

5. Äggen och spermielösningen bör få stå och ”interagera” i minst 15 minuter och de befruktade äggen placeras i exponeringsakvarierna inom 1,5 timmar efter befruktningen.

6. Förfarandet upprepas med en annan hona till dess att det önskade antalet ägg har samlats in.

7. Behåll ett fåtal ägg från den sista omgången och fixera dem i 10 % ättiksyra.

▼M6

Räkning och fördelning av äggen i testakvarier

1. Äggen bör fördelas jämnt mellan varje behandlingsnivå för att undvika systematiska genetiska avvikelser. Varje parti befruktade ägg bör delas upp i lika stora grupper (lika många som behandlingsnivåerna) med hjälp av ett trubbigt instrument (t.ex. en insektspincett med bred spets eller med hjälp av en ympögla). Om man ämnar ha fyra replikat per testkärl med 20 ägg i varje måste man fördela 80 ägg per exponeringsakvarium. Viktig anmärkning: Det rekommenderas att man lägger till ytterligare 20 % (dvs. 96 ägg per behandlingsnivå) till dess att man är säker på att man har 100 % befruktningsfrekvens.

2. Spiggägg är mycket känsliga för svampinfektioner utanför boet, som vaktas av fadern. I detta hänseende är det av avgörande betydelse att alla ägg behandlas med metylenblått under de fem första dagarna av testet. En stamlösning med metylenblått bereds vid 1 mg/ml och tillsätts i exponeringsakvarierna för att ge en högsta slutlig koncentration på 2,125 mg/l. Viktig anmärkning: Spigg bör inte exponeras för metylenblått när de har kläckts. Systemet bör vara fritt från metylenblått senast på dag 6.

3. Äggen ska kontrolleras dagligen och eventuella döda eller obefruktade ägg registreras som sådana. Viktig anmärkning: Äggen bör aldrig befinna sig utanför vattnet innan kläckningen ens under mycket korta perioder.

▼M6

C.42 BIOLOGISK NEDBRYTBARHET I HAVSVATTEN

ALLMÄN INLEDNING

1. Denna testmetod motsvarar OECD:s testriktlinje (TG) 306 (1992). När de ursprungliga testmetoderna utarbetades var det inte känt i vilken utsträckning resultaten från ett screeningtest för lätt bionedbrytbarhet där man använder sötvatten, och spillvatten eller aktiverat slam som inokulat, kan tillämpas på den marina miljön. Olika resultat på denna punkt har rapporterats (t.ex. 1)

2. Många industriella avloppsvatten som innehåller ett stort antal kemikalier når havet antingen genom direkt utsläpp eller genom flodmynningar och floder där retentionstiden är kort jämfört med den tid som krävs för fullständig biologisk nedbrytning av många av de kemikalier som förekommer i avloppsvattnet. På grund av den ökande medvetenheten om behovet av att skydda den marina miljön mot ökad belastning av kemikalier och behovet av att uppskatta den sannolika koncentrationen av kemikalier i havet har testmetoder för biologisk nedbrytbarhet i havsvatten utarbetats.

3. I de metoder som beskrivs här används naturligt havsvatten både som vattenfas och som källa till mikroorganismer. I en strävan att använda samma metoder som för lätt bionedbrytbarhet i sötvatten undersökte man möjligheten att använda ultrafiltrerat havsvatten, och även användningen av marina sediment som inokulat. Dessa undersökningar rönte ingen framgång. Testmediet är därför naturligt havsvatten som förbehandlats för att avlägsna grova partiklar.

4. För att bedöma den fullständiga biologiska nedbrytbarheten med skakkolvmetoden måste relativt höga koncentrationer av testämnet användas på grund av den dåliga känsligheten hos analysmetoden med löst organiskt kol (DOC). Detta gör i sin tur att man måste tillsätta oorganiska näringsämnen (N och P) till havsvattnet, eftersom mineralnäringsämnenas låga koncentration i annat fall skulle begränsa elimineringen av DOC. Det är även nödvändigt att lägga till dessa näringsämnen i closed bottle-metoden på grund av det tillagda testämnets koncentration.

5. Metoderna är sålunda inte tester för lätt bionedbrytbarhet eftersom man inte lägger till något inokulat utöver de mikroorganismer som redan finns i havsvatten. Inte heller simulerar testerna den marina miljön, eftersom näringsämnen läggs till och testämnets koncentration är mycket högre än i havet. Av dessa skäl föreslås dessa metoder inom ramen för ett nytt underavsnitt, ”Biologisk nedbrytbarhet i havsvatten”.

TILLÄMPNING

6. Resultaten av testet, som skulle tillämpas om mönstret för det aktuella ämnets användning och omhändertagande tyder på det hamnar i havet, ger en första indikation på den biologiska nedbrytbarheten i havsvatten. Om resultatet är positivt (> 70 % DOC-eliminering, > 60 % ThOD – teoretisk syreförbrukning) kan man dra slutsatsen att det finns en kapacitet för biologisk nedbrytning i den marina miljön. Ett negativt resultat utesluter dock inte denna kapacitet utan anger att det behövs ytterligare undersökningar, till exempel genom användning av en så låg koncentration av testämnet som möjligt.

▼M6

7. Om man behöver ett mer definitivt värde på den biologiska nedbrytningens hastighet eller omfattning i havsvatten på en särskild plats, måste man i vilket fall som helst använda andra metoder som är mer komplexa och sofistikerade, och därmed dyrare. Exempelvis kan ett simuleringstest göras med en koncentration av testämnet som ligger närmare den förväntade koncentrationen i miljön. Även icke-mättat, icke-förbehandlat havsvatten från det område som undersöks kan användas, och den primära bionedbrytningen kan följas med hjälp av särskilda kemiska analyser. För fullständig biologisk nedbrytbarhet skulle det vara nödvändigt att använda ^{14}C-märkta ämnen så att elimineringshastigheterna för lösligt organiskt ^{14}C och produktionen av $^{14}CO_2$ vid miljömässigt realistiska koncentrationer kan mätas.

VAL AV METOD

8. Valet av den metod som ska användas beror på en mängd olika faktorer. Följande tabell kan användas som hjälp vid metodvalet. Ämnen med vattenlöslighet som ligger under motsvarande cirka 5 mg C/l kan inte testas med skakkolvmetoden, men svårlösliga ämnen kan, åtminstone i princip, testas med closed bottle-metoden.

Tabell

Fördelar och nackdelar med skakkolv- och closed bottle-metoden

METOD	FÖRDELAR	NACKDELAR
SKAKKOLV-METODEN	— enkel utrustning med undantag för C-analysatorn — varaktigheten på 60 dagar utgör inte ett problem — ingen interferens från nitrifikationen — kan anpassas för flyktiga ämnen	— det behövs en C-analysator — använder 5–40 mg DOC/1, skulle kunna verka hämmande — DOC-bestämningen är svår vid låga koncentrationer i havsvatten (klorideffekt) — DOC-värdena ibland höga i havsvatten
CLOSED BOTTLE-METODEN	— enkel utrustning — enkel bestämning av slutdatum — mindre risk för hämning p.g.a. låga koncentrationer av testämnet (2 mg/l) — kan lätt anpassas till flyktiga ämnen	— lufttätheten i kolvarna kan vara svår att upprätthålla — tillväxt av bakterier på kärlväggarna kan leda till felaktiga värden — blankprovets upptagningsvärden för O_2 kan vara höga, särskilt efter 28 dagar; detta kan hanteras genom att havsvattnet får åldras — möjlig interferens från upptagningen av O_2 genom nitrifikation

SKAKKOLVMETODEN

INLEDNING

1. Denna metod är en havsvattenvariant av det modifierade OECD-screeningtest som beskrivs i kapitel C.4B i denna bilaga (2). Det fick slutgiltigt godkännande efter ett ringtest som organiserades för Europeiska kommissionen (EC) av det danska vattenkvalitetsinstitutet (3).

2. I likhet med den åtföljande marina closed bottle-metoden ska resultaten från detta test inte anses utgöra indikatorer på lätt bionedbrytbarhet, men ska uttryckligen användas för att skaffa information om bionedbrytbarheten för ämnen i marina miljöer.

▼M6

PRINCIP FÖR TESTMETODEN

3. En förutbestämd mängd testämne löses upp i testmediet till dess att koncentrationen löst organiskt kol (DOC)/l når 5–40 mg. Om känslighetsgränserna för analyser av organiskt kol förbättras kan det vara en fördel att använda lägre koncentrationer av testämnet, i synnerhet för ämnen som verkar hämmande. Testämneslösningen i testmediet inkuberas under skakning i mörker eller indirekt ljus under aeroba förhållanden vid en konstant temperatur (med en variation på högst ± 2 °C) som normalt ligger inom intervallet 15–20 °C. Om syftet med undersökningen är att simulera situationer i miljön kan testerna utföras bortom detta normala temperaturintervall. Den rekommenderade maximala varaktigheten för testet är cirka 60 dagar. Nedbrytningen följs med hjälp av mätningar av DOC (fullständig nedbrytning) samt, i vissa fall, med hjälp av särskilda analyser (primär nedbrytning).

INFORMATION OM TESTÄMNET

4. För att veta om testet kan tillämpas på ett visst ämne måste vissa av dess egenskaper vara kända. Ämnets halt av organiskt kol måste fastställas, dess flyktighet ska vara sådan att betydande förluster inte förekommer under testets gång och dess löslighet i vatten bör vara större än motsvarande 25–40 mg C/l. Testämnet bör dessutom inte adsorberas på glasytor i större mängd. Uppgifter om renheten eller de relativa proportionerna av testämnets huvudbeståndsdelar är nödvändiga för att de erhållna resultaten ska kunna tolkas, särskilt om resultatet ligger nära ”godkänd” nivå.

5. Information om testämnets toxicitet för bakterier, t.ex. uppmätt i kortvariga respirationstester (4), kan vara användbar vid valet av lämpliga testkoncentrationer och kan vara väsentlig när det gäller den korrekta tolkningen av låga värden för biologisk nedbrytbarhet. Sådan information är dock inte alltid tillräcklig för tolkning av resultaten från testet av biologisk nedbrytbarhet, och det förfarande som beskrivs i punkt 18 är lämpligare.

REFERENSÄMNEN

6. Lämpliga referensämnen måste användas för att kontrollera den mikrobiella aktiviteten i havsvattenproven. Natriumacetat, natriumbensoat och anilin är exempel på ämnen som kan användas för detta ändamål. Referensämnena måste brytas ned inom en rimligt kort tidsperiod, och om detta inte sker rekommenderas att testet upprepas med ett annat havsvattenprov.

7. I kommissionens ringtest, där havsvattenprover togs på olika platser och vid olika tider på året (3), var lagfasen (t_L) och den tid som behövdes för att uppnå en 50-procentig nedbrytning (t_{50}) exklusive lagfasen 1–4 dagar respektive 1–7 dagar för natriumbensoat. För anilin varierade t_L mellan 0 och 10 dagar, medan t_{50} varierade mellan 1 och 10 dagar.

METODENS REPRODUCERBARHET OCH KÄNSLIGHET

8. Metodens reproducerbarhet fastställdes i ringtestet (3). Testämnets lägsta koncentration vid vilken denna metod kan användas med DOC-analys beror till största delen på detektionsgränsen för den organiska kolanalysen (för närvarande cirka 0,5 mg C/l) och koncentrationen av löst organiskt kol i det havsvatten som används (vanligen i storleksordningen 3–5 mg/l för vatten från öppna havet). Bakgrundskoncentrationen av DOC bör inte överstiga ca 20 % av den totala DOC-koncentration efter tillförsel av testämnet.

▼M6

Om detta inte är möjligt kan bakgrundskoncentrationen av DOC ibland minskas genom åldrande av havsvattnet före testet. Om metoden endast används tillsammans med särskild kemisk analys (genom vilken den primära nedbrytningen mäts), måste utredaren genom att tillhandahålla ytterligare information ange huruvida man kan förvänta sig fullständig nedbrytbarhet. Denna ytterligare information kan bestå av resultat från andra test för lätt eller inneboende bionedbrytbarhet.

BESKRIVNING AV TESTMETODEN

Utrustning

9. Vanlig laboratorieutrustning och följande:

   a. skakapparat som rymmer 0,5–2 liter erlenmeyerkolvar, antingen med automatisk temperaturreglering eller placerad i en lokal med konstant temperatur på 15–20 °C med högst ± 2 °C variation,

   b. smalhalsade 0,5–2 ml erlenmeyerkolvar,

   c. utrustning för membranfiltrering eller en centrifug,

   d. membranfilter, 0,2–0,45μm,

   e. kolanalysator,

   f. utrustning för särskild analys (frivilligt).

Havsvatten

10. Samla in ett prov med havsvatten i en väl rengjord behållare och transportera det till laboratoriet, helst inom en eller två dagar efter insamlingen. Under transporten får provets temperatur inte väsentligt överstiga den temperatur som ska användas i testet. Ange insamlingsplatsen exakt och beskriv den i fråga om förorenings- och näringsstatus. Särskilt när det gäller kustvatten bör antalet kolonier av heterotrofa mikroorganismer och en bestämning av koncentrationerna av upplöst nitrat, ammonium och fosfat ingå i denna beskrivning.

11. Ange följande uppgifter för havsvattenprovet i sig:

   — insamlingsdatum,

   — provtagningsdjup,

   — provets utseende – grumligt osv.,

   — temperatur vid insamlingstillfället,

   — salthalt,

   — DOC,

   — tid mellan provtagningen och användningen i testet.

12. Om halten löst organiskt kol (DOC) i havsvattenprovet befinns vara hög (punkt 8) rekommenderas att havsvattnet får åldras i cirka en vecka före användning. Lagra provet under aeroba förhållanden vid testtemperaturen och i mörker eller indirekt ljus. Bibehåll de aeroba förhållandena genom

▼M6

skonsam luftning vid behov. Under åldringsprocessen minskar innehållet av lätt nedbrytbara organiska material. I ringtestet (3) framkom det inga skillnader mellan potentialen för nedbrytning i åldrade och nyinsamlade havsvattenprov. Före användning ska havsvattnet förbehandlas för att avlägsna grova partiklar, exempelvis genom filtrering genom ett nylonfilter eller grovt pappersfilter (inte membran eller GF/C-filter), eller genom sedimentering och dekantering. Det förfarande som används måste anges. Om man låter vattnet åldras, görs förbehandlingen efter detta.

Stamlösningar för oorganiska näringsämnen

13. Följande stamlösningar framställs av reagens av analyskvalitet:

(a)	Kaliumdivätefosfat, KH_2PO_4	8,50 g
	Dikaliumväteortofosfat, K_2HPO_4	21,75 g
	Dinatriumväteortofosfat dihydrat, $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	33,30 g
	Ammoniumklorid, NH_4Cl	0,50 g
	Lös upp och fyll på till 1 liter med destillerat vatten.	
(b)	Kalciumklorid, $CaCl_2$	27,50 g
	Lös upp och fyll på till 1 liter med destillerat vatten.	
(c)	Magnesiumsulfatheptahydrat, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	22,50 g
	Lös upp och fyll på till 1 liter med destillerat vatten.	
(d)	Järn(III)kloridhexahydrat, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0,25 g
	Lös upp och fyll på till 1 liter med destillerat vatten.	

Utfällning i lösning (d) kan förebyggas genom tillsats av en droppe koncentrerad HCl eller 0,4 g etylendiamintetraättiksyra (EDTA, dinatriumsalt) per liter. Om utfällning konstateras i en stamlösning ersätts den med nyberedd lösning.

Beredning av testmediet

14. Tillsätt 1 ml av var och en av stamlösningarna ovan per liter förbehandlat havsvatten.

Inokulat

15. Tillsätt inte särskilda inokulat utöver de mikroorganismer som redan finns i havsvattnet. Fastställ (eventuellt) antalet kolonibildande heterotrofer i havsvattentestmediet (och helst också i de ursprungliga havsvattenproverna), t.ex. genom platträkning med marin agar. Detta är särskilt lämpligt för prover från kustområden eller förorenade områden. Kontrollera den heterotrofa mikrobiella aktiviteten i havsvattnet genom att utföra ett test med ett referensämne.

▼M6

Förberedelse av kolvar

16. Se till att alla glaskärl är ytterst noggrant rengjorda men inte nödvändigtvis steriliserade (t.ex. med hjälp av alkoholisk saltsyra), sköljda och torkade före användning för att undvika kontaminering med rester från tidigare tester. Kolvarna ska också rengöras före första användningen.

17. Utvärdera testämnet i två flaskor samtidigt, tillsammans med en enda kolv för referensämnet. Utför ett blankprov i två exemplar med varken test- eller referensämne för bestämning av analytiska blanklösningar. Lös upp testämnena i testmediet – de kan enkelt tillsättas via en koncentrerad stamlösning – så att man får de önskade startkoncentrationerna, som normalt är 5–40 mg DOC/l. Referensämnet testas normalt vid en startkoncentration motsvarande 20 mg DOC/l. Se till att salthalten i havsvattenmediet inte ändras avsevärt om stamlösningar av test- och/eller referensämnen används.

18. Om toxiska effekter kan förväntas eller inte kan uteslutas kan det vara lämpligt att ett hämningsexperiment i två exemplar läggs till i testets utformning. Eftersom referensämnets koncentration normalt är densamma som i kontrolltestet (dvs. 20 mg DOC/l) tillsätts test- och referensämnen i samma kärl för att möjliggöra jämförelser.

19. Fördela tillräckliga mängder testlösningar i erlenmeyerkolvarna (upp till omkring hälften av flaskvolymen är en lämplig mängd) och lägg därefter ett löst lock på varje kolv (t.ex. aluminiumfolie) som möjliggör gasutbyte mellan kolven och den omgivande luften. (Bomullspluggar är olämpliga om man använder en DOC-analys). Placera kärlen i skakapparaten och skaka dem kontinuerligt vid låg frekvens (t.ex. 100 rpm) under hela testet. Kontrollera temperaturen (15–20 °C med ± 2 °C noggrannhet), och skydda kärlen mot ljus i syfte att undvika tillväxt av alger. Se till att luften är fri från giftiga ämnen.

Fysikalisk-kemiskt kontrolltest (frivilligt)

20. Om man misstänker att det förekommer abiotisk nedbrytning eller abiotiska förlustmekanismer, t.ex. hydrolys (ett problem endast i särskilda analyser), avdunstning eller adsorption, är det lämpligt att genomföra ett fysikalisk-kemiskt kontrollexperiment. Detta kan göras genom tillägg av kvicksilver(II)klorid ($HgCl_2$) ([5]) (50–100 mg/l) i kärlen med testämne i syfte att hejda den mikrobiella aktiviteten. En betydande minskning av DOC eller av det särskilda ämnets koncentration i det fysikalisk-kemiska kontrolltestet tyder på abiotiska elimineringsmekanismer. (Om kvicksilverklorid används, bör man ägna särskild uppmärksamhet åt interferenser eller katalysatorförgiftning i DOC-analysen.)

Antal kolvar

21. I en typisk testomgång används följande kolvar:

Kolv 1 & 2 – innehåller testämne (testsuspension),

Kolv 3 & 4 – innehåller endast havsvatten (blank),

Kolv 5 – innehåller referensämne (förfarandekontroll),

Kolv 6 – innehåller test- och referensämne (toxicitetskontroll) – frivilligt,

Kolv 7 – innehåller testämne och steriliseringsämnet (abiotisk steril kontroll) – frivilligt.

([5]) Kvicksilver(II)klorid ($HgCl_2$) är ett mycket giftigt ämne som bör hanteras med lämpliga försiktighetsåtgärder. Vattenhaltigt avfall som innehåller denna kemikalie bör bortskaffas på lämpligt sätt. Det bör inte släppas ut i avloppssystemet.

▼M6

Analys av löst organiskt kol (DOC)

22. Under testets gång tas prover med lämpliga intervaller för analys av DOC (tillägg 1). Ta alltid prover vid testets början (dag 0) och på dag 60. Minst fem prover totalt krävs för att beskriva nedbrytningens tidsförlopp. Något bestämt tidsschema för provtagningen kan inte anges eftersom den biologiska nedbrytningshastigheten varierar. Bestäm DOC i två exemplar för varje prov.

Provtagning

23. Den erforderliga provmängden beror på analysmetoden (särskild analys), på den använda kolanalysatorn, och på det valda förfarandet (membranfiltrering eller centrifugering) för behandlingen av proverna före kolbestämningen (punkterna 25 och 26). Se före provtagningen till att testmediet blandats väl och att allt material som sitter fast på kolvens väggar har lösts upp eller suspenderats.

24. Membranfiltrera eller centrifugera omedelbart efter provtagningen. Förvara vid behov de filtrerade eller centrifugerade proverna vid 2–4 °C i upp till 48 timmar, eller under – 18 °C under längre perioder (om det är känt att ämnet kommer att förbli oförändrat ska det surgöras till pH 2 före lagring).

25. Membranfilter (0,2–0,45 μm) är lämpliga om det kan garanteras att de varken frigör kol eller adsorberar ämnet i filtreringssteget, t.ex. membranfilter av polykarbonat. Vissa membranfilter är impregnerade med ytaktiva ämnen för hydrofilering, vilket kan leda till att de frigör betydande mängder upplöst kol. Bearbeta sådana filter genom kokning i avjonat vatten i tre på varandra följande perioder på en timme vardera. Efter kokning lagras filtren i avjonat vatten. Kassera de första 20 ml av filtratet.

26. Centrifugering av proverna kan väljas som ett alternativ till membranfiltrering. Centrifugera vid 40 000 $m.s^{-2}$ (ca 4 000 g) i 15 minuter, helst i en kylcentrifug.

Anmärkning: Det tycks inte fungera att differentiera mellan totalhalten organiskt kol (TOC) och DOC (TOC/DOC) genom centrifugering vid mycket låga koncentrationer, eftersom antingen alla bakterier inte avlägsnas eller kolet som är en del av bakteriernas cytoplasma återupplöses. Vid högre testkoncentrationer (> 10 mg C per liter) tycks felen efter centrifugering vara jämförelsevis små.

Provtagningsfrekvens

27. Om analyserna utförs omedelbart efter provtagningen bör man uppskatta nästa provtagningstid genom att beakta resultatet av den analytiska bestämningen.

28. Om proverna bevaras (punkt 24) för analys vid en senare tidpunkt ska man ta fler prover än fem, som är det minsta tillåtna antalet. De sista proverna ska analyseras först, och genom ett stegvis urval ”bakåt” av lämpliga prover för analys är det möjligt att erhålla en god beskrivning av den biologiska nedbrytningskurvan med ett relativt litet antal analytiska bestämningar. Om ingen nedbrytning har skett i slutet av testet behöver inga ytterligare prov analyseras, och i denna situation kan ”bakåt”-strategin innebära stora besparingar i analyskostnader.

▼M6

29. Om en platå på nedbrytningskurvan iakttas före dag 60 ska testet avslutas. Om det på dag 60 är tydligt att nedbrytningen har inletts men inte har nått en platå, ska försöket förlängas med ytterligare en tidsperiod.

DATA OCH RAPPORTERING

Behandling av resultaten

30. Registrera analysresultaten på bifogade resultatformulär (tillägg 2) och beräkna bionedbrytningsvärdena både för test- och referensämnena med följande ekvation:

$$D_t = \left[1 - \frac{C_t - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}}\right] \times 100$$

där

D_t = nedbrytning i procent DOC eller eliminering av ett särskilt ämne vid tidpunkten t,

C_o = startkoncentration för DOC eller det särskilda ämnet i testmediet,

C_t = koncentration för DOC eller det särskilda ämnet i testmediet vid tidpunkten t,

$C_{bl(0)}$ = startkoncentration för DOC eller det särskilda ämnet i blankprovet,

$C_{bl(t)}$ = koncentration för DOC eller det särskilda ämnet i blankprovet vid tidpunkten t.

31. Ange nedbrytningen som procentandelen DOC som har eliminerats (fullständig nedbrytning) eller av det särskilda ämne som har eliminerats (primär nedbrytning) vid tidpunkten t. Beräkna DOC-koncentrationerna till närmaste 0,1 mg per liter, och avrunda medelvärdena för D_t-värdena till närmaste hela procent.

32. Illustrera nedbrytningens förlopp grafiskt i ett diagram på det sätt som visas i figuren i ”Resultatens giltighet och deras tolkning”. Om det finns tillräckliga data bör man utifrån nedbrytningskurvan beräkna lagfasen (t_L) och den tid som krävs för att nå 50 procents eliminering från lagfasens slut (t_{50}).

Testrapport

33. Testrapporten måste innehålla följande information:

Testämne:

— fysikalisk form och, när så är tillämpligt, fysikalisk-kemiska egenskaper,

— identifikationsuppgifter.

Testbetingelser:

— beskrivning av provtagningsstället och dess läge: förorenings- och näringsstatus (koloniräkning, nitrat, ammonium, fosfat i tillämpliga fall),

— beskrivning av provet (datum för provtagning, djup, utseende, temperatur, salthalt, DOC (frivillig uppgift), tid mellan provtagning och användning i testet),

▼M6

— metod som används (i förekommande fall) för åldrande av havsvatten,

— metod som används för förbehandling (filtrering/sedimentering) av havsvattnet,

— metod som används för bestämning av DOC,

— metod som används för särskild analys (frivillig uppgift),

— metod som används för att fastställa antalet heterotrofer i havsvattnet (platträkning eller alternativt förfarande) (frivilligt),

— andra metoder (frivillig uppgift) som används för att karakterisera havsvattnet (mätning av ATP-halten osv.).

Resultat:

— analysdata rapporteras på ett resultatformulär (tillägg 2),

— nedbrytningstestets förlopp illustreras grafiskt i ett diagram som visar lagfasen (t_L), lutningen och den tid det tar (från lagfasens slut) för att nå 50 procents eliminering (t_{50}). Lagfasen kan uppskattas grafiskt såsom visas i figuren i avsnittet ”Resultatens giltighet och deras tolkning” eller kan lämpligen antas vara den tid som krävs för 10 procents nedbrytning,

— den procentuella nedbrytningen mäts efter 60 dagar, eller vid testets avslutning.

Diskussion av resultaten.

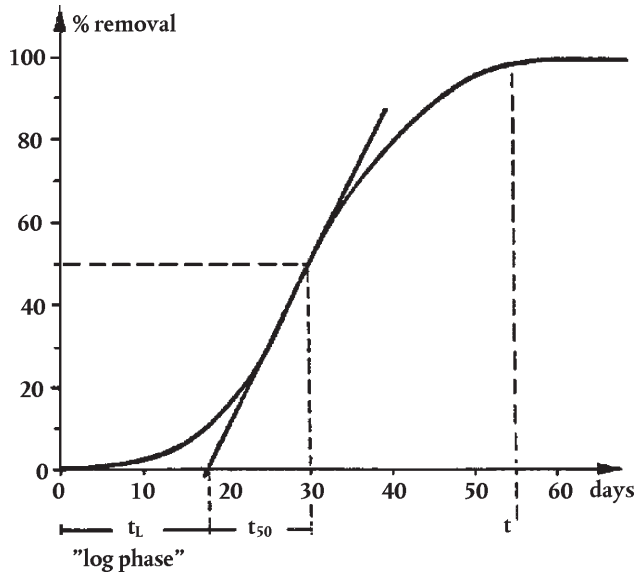
Resultatens giltighet och deras tolkning

34. De resultat som erhålls med referensämnen, t.ex. natriumbensoat, natriumacetat och anilin, bör vara jämförbara med resultaten i ringtestet (3) (se avsnittet om ”Referensämnen”, punkt 7). Om de resultat som erhållits med referensämnen är atypiska bör testet upprepas med ett annat havsvattenprov. Resultaten från hämningstester är inte alltid lätta att tolka på grund av att testämnet bidrar till DOC, men en betydande minskning av den totala graden av DOC-eliminering jämfört med kontrollen är ett positivt tecken på toxiska effekter.

35. På grund av de relativt höga testkoncentrationer som används jämfört med de koncentrationer som förekommer i de flesta naturliga system (och följaktligen ett ogynnsamt förhållande mellan testämnens och andra kolkällors koncentrationer) bör metoden betraktas som ett preliminärt test som kan användas för att ge en antydan om huruvida ett ämne är lätt biologiskt nedbrytbart. Ett lågt resultat behöver därför inte nödvändigtvis betyda att testämnet inte är bionedbrytbart i marina miljöer, men visar att det krävs mer arbete för att detta förhållande ska kunna fastställas.

Ett exempel på ett teoretiskt nedbrytningsförsök som illustrerar ett möjligt sätt att beräkna värdena för t_L (lagfasens längd) och t_{50} (den tid som behövs från lagfasens slut för att uppnå 50 procents eliminering) finns i figuren nedan.

▼M6



CLOSED BOTTLE-METODEN

INLEDNING

1. Denna metod är en havsvattenvariant av closed bottle-testet (5), och fick slutligt godkännande efter ett ringtest som organiserades för Europeiska kommissionen (EC) av det danska vattenkvalitetsinstitutet (3).

2. I likhet med den åtföljande marina skakkolvmetoden ska resultaten från detta test inte uppfattas som indikationer på lätt bionedbrytbarhet, utan ska uttryckligen användas för att skaffa information om bionedbrytbarheten för ämnen i marina miljöer.

PRINCIP FÖR TESTMETODEN

3. Ett förutbestämd mängd av testämnet upplöses i testmediet med en koncentration på vanligen 2–10 mg testämne per liter (en eller flera koncentrationer kan användas). Lösningen förvaras i en fylld försluten kolv i mörker i ett bad eller rum med konstant temperatur på 15–20 °C med en variation på högst ± 1 °C. Om syftet med undersökningen är att simulera situationer i miljön kan testerna utföras bortom detta normala temperaturintervall förutsatt att lämpliga justeringar görs för temperaturreglering. Nedbrytningen följs med hjälp av syreanalyser under en 28-dagarsperiod.

4. Ringtestet visade att om testet förlängdes efter 28 dagar kunde i de flesta fall ingen användbar information inhämtas på grund av allvarliga störningar. Värdena för den biokemiska syreförbrukningen (BOD) i blankprovet var mycket höga, förmodligen på grund av algväxt på kärlets väggar som orsakades av brist på skakning, och på grund av nitrifikation. Den rekommenderade varaktigheten är därför 28 dagar, men om BOD-värdet i blankprovet håller sig inom 30-procentsgränsen (punkterna 15 och 40) kan testet förlängas.

INFORMATION OM TESTÄMNET

5. För att veta om testet kan tillämpas på ett visst ämne måste vissa av dess egenskaper vara kända. Man måste ha den empiriska formeln så att den teoretiska syreförbrukningen (ThOD) kan beräknas (se tillägg 3). I annat fall måste ämnets kemiska syreförbrukning (COD) fastställas och tjäna som referensvärde. Användningen av COD är mindre tillfredsställande eftersom vissa ämnen inte oxideras helt i COD-testet.

▼M6

6. Ämnets löslighet bör vara minst 2 mg/l, men i princip kan mindre lösliga ämnen testas (t.ex. med hjälp av ultrasonikering), liksom flyktiga ämnen. Uppgifter om renheten eller de relativa proportionerna av testämnets huvudbeståndsdelar är nödvändiga för att de erhållna resultaten ska kunna tolkas, särskilt om resultatet ligger nära ”godkänd” nivå.

7. Information om testämnets toxicitet för bakterier, t.ex. uppmätt i kortvariga respirationstester (4), kan vara mycket användbar vid valet av lämpliga testkoncentrationer och kan vara väsentlig när det gäller den korrekta tolkningen av låga värden för biologisk nedbrytbarhet. Sådan information är dock inte alltid tillräcklig för tolkning av resultaten från testet av biologisk nedbrytbarhet, och det förfarande som beskrivs i punkt 27 är lämpligare.

REFERENSÄMNEN

8. Lämpliga referensämnen måste användas för att kontrollera den mikrobiella aktiviteten i havsvattenproven. Anilin, natriumacetat eller natriumbensoat (exempelvis) kan användas för detta ändamål. En nedbrytning av dessa ämnen på minst 60 procent (av deras ThOD) måste äga rum inom en rimligt kort tidsperiod, annars rekommenderas att testet upprepas med ett annat havsvattenprov.

9. I kommissionens ringtest, där havsvattenprover togs på olika platser och vid olika tider på året, var lagfasen (t_L) och den tid som behövdes för att uppnå en 50-procentig nedbrytning (t_{50}) exklusive lagfasen 0–2 dagar respektive 1–4 dagar för natriumbensoat. För anilin var t_L och t_{50}-värdena 0–7 respektive 2–12 dagar.

REPRODUCERBARHET

10. Metodernas reproducerbarhet fastställdes i kommissionens ringtest (3).

BESKRIVNING AV TESTMETODEN

Utrustning

11. Normal laboratorieutrustning och

(a) 250–300 ml BOD-kolvar med glaspropp eller smalhalsade 250 ml kolvar med glaspropp kan användas,

(b) flera 2-, 3- och 4-liters kolvar med litergradering för förberedelse av försöket och för tappning av BOD-kolvarna,

(c) vattenbad eller rum med konstant temperatur för att hålla kolvarna vid konstant temperatur (± 1 °C) i mörker,

(d) utrustning för analys av löst syre,

(e) membranfilter, 0,2–0,45 μm (frivilligt),

(f) utrustning för särskild analys (frivilligt).

Havsvatten

12. Samla in ett havsvattenprov i en väl rengjord behållare och transportera det till laboratoriet, helst inom en eller två dagar efter insamlingen. Provets temperatur under transporten får inte avsevärt överstiga den temperatur som råder vid testet.

▼M6

13. Ange insamlingsplatsen exakt och beskriv den i fråga om förorenings- och näringsstatus. Särskilt när det gäller kustvatten eller förorenade vatten bör det i denna beskrivning ingå en räkning av kolonier av heterotrofa mikroorganismer och en bestämning av koncentrationerna för löst nitrat, ammonium och fosfat.

14. Ange följande uppgifter för havsvattenprovet i sig:

— insamlingsdatum,

— provtagningsdjup,

— provets utseende – grumligt osv.,

— temperatur vid provtagningstillfället,

— salthalt,

— löst organiskt kol (DOC),

— tid mellan provtagningen och användningen i testet.

15. Om DOC-halten i provet befinns vara hög eller om det kan antas att det blankprovets BOD efter 28 dagar kommer att mer än 30 procent högre än för referensämnena rekommenderas att havsvattnet får åldras i cirka en vecka före användning.

16. Låt provet åldras genom lagring under aeroba förhållanden vid testtemperaturen och i mörker eller indirekt ljus. Bibehåll de aeroba förhållandena genom skonsam luftning vid behov. Under åldringsprocessen minskar innehållet av lätt nedbrytbara organiska material. I ringtestet (3) framkom det inga skillnader mellan nedbrytningspotentialen i åldrade och nyinsamlade havsvattenprov.

17. Före användning ska havsvattnet förbehandlas för att avlägsna grova partiklar, exempelvis genom filtrering genom ett nylonfilter eller grovt pappersfilter (inte membran eller GF/C-filter), eller genom sedimentering och dekantering. Ange den metod som har använts. Om man låter vattnet åldras, görs förbehandlingen efter detta.

Stamlösningar för oorganiska näringsämnen

18. Följande stamlösningar framställs av reagens av analyskvalitet:

(a)	Kaliumdivätefosfat, KH_2PO_4	8,50 g
	Dikaliumväteortofosfat, K_2HPO_4	21,75 g
	Dinatriumväteortofosfat dihydrat, $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	33,30 g
	Ammoniumklorid, NH_4Cl	0,50 g
	Lös upp och fyll på till 1 liter med destillerat vatten.	
(b)	Kalciumklorid, $CaCl_2$	27,50 g
	Lös upp och fyll på till 1 liter med destillerat vatten.	
(c)	Magnesiumsulfatheptahydrat, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	22,50 g
	Lös upp och fyll på till 1 liter med destillerat vatten.	
(d)	Järn(III)kloridhexahydrat, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0,25 g
	Lös upp och fyll på till 1 liter med destillerat vatten.	

▼M6

Utfällning i lösning (d) kan förebyggas genom tillsats av en droppe koncentrerad HCl eller 0,4 g etylendiamintetraättiksyra (EDTA, dinatriumsalt) per liter. Om utfällning konstateras i en stamlösning ersätts den med nyberedd lösning.

Beredning av testmediet

19. Tillsätt 1 ml av var och en av de ovannämnda stamlösningarna per liter förbehandlat havsvatten. Mätta testmediet med luft vid testtemperaturen genom luftning med ren tryckluft i ca 20 minuter. Bestäm halten löst syre för kontrolländamål. Mättnadskoncentrationen för löst syre som en funktion av salthalt och temperatur kan avläsas i det nomogram som bifogas denna testmetod (tillägg 4).

Inokulat

20. Tillsätt inte särskilda inokulat utöver de mikroorganismer som redan finns i havsvattnet. Fastställ (eventuellt) antalet kolonibildande heterotrofer i havsvattentestmediet (och helst också i de ursprungliga havsvattenproverna), t.ex. genom platträkning med marin agar. Detta är särskilt lämpligt för prover från kustområden eller förorenade områden. Kontrollera den heterotrofa mikrobiella aktiviteten i havsvattnet genom att utföra ett test med ett referensämne.

Beredning av testkolvarna

21. Utför alla nödvändiga modifieringar inbegripet åldrande och förbehandling av havsvattnet vid den valda testtemperaturen mellan 15–20 °C, och se till att alla glaskärl är rena men inte sterila.

22. Förbered grupper av BOD-kolvar för bestämningen av BOD för test- och referensämnena i samtidiga försöksserier. Utför alla analyser på två kolvar (blankprov, referens- och testämnen), dvs. bered två kolvar för varje bestämning. Utför analyser åtminstone på dag 0, 5, 15 och 28 (fyra bestämningar). För syreanalyser måste man för fyra bestämningar ha sammanlagt $3 \times 2 \times 4 = 24$ kolvar (blankprov, referens- och testämne), och därmed ca 8 liter testmedium (för en testämneskoncentration).

23. Bered separata lösningar av test- och referensämnen i stora kolvar med tillräckligt stor volym (punkt 11) genom att först tillsätta test- och referensämnena, antingen direkt eller via en koncentrerad stamlösning, till de delvis fyllda stora kolvarna. Tillsätt ytterligare testmedium till dess att de önskade slutliga koncentrationerna erhålls. Se till att salthalten i havsvattenmediet inte ändras avsevärt om stamlösningar av test- och/eller referensämnen används.

24. Välj koncentrationer för test- och referensämnen genom att beakta

(a) lösligheten för syre i havsvatten vid den rådande testtemperaturen och salthalten (se bifogat nomogram – tillägg 4),

(b) blankprovets BOD i havsvatten, och

(c) testämnets förväntade biologiska nedbrytbarhet.

▼M6

25. Vid 15 °C och 20 °C och en salthalt på 32 promille (vatten från öppet hav) är lösligheten för syre ca 8,1 respektive 7,4 mg/l. Syreförbrukningen i havsvattnet i sig (respirationen i blankprovet) kan vara 2 mg O_2/l eller mer om havsvattnet inte har fått åldras. För att garantera att en betydande koncentration av syre återstår efter oxidering av testämnet använder man en startkoncentration för testämnet på ca 2–3 mg/l (beroende på ThOD) för de ämnen som förväntas brytas ned helt under testbetingelserna (t.ex. referensämnen). Testa mindre nedbrytbara ämnen vid högre koncentrationer, upp till ca 10 mg/l, under förutsättning att det inte förekommer några toxiska verkningar. Det kan vara fördelaktigt att köra parallella test med en låg (cirka 2 mg/l) och en hög (cirka 10 mg/l) koncentration av testämnet.

26. Ett blankvärde för syre ska bestämmas parallellt i kolvar som innehåller varken test- och referensämne.

27. Om hämmande effekter ska fastställas bereds följande rad lösningar i separata stora kolvar (punkt 13):

(a) 2 mg per liter lätt nedbrytbart ämne, t.ex. någon av de referensämnen som anges,

(b) x mg per liter testämne (x är vanligtvis 2),

(c) 2 mg per liter lätt nedbrytbart ämne plus x mg per liter testämne.

Fysikalisk-kemiskt kontrolltest (frivilligt)

28. Om man använder sig av möjligheten att använda särskilda analyser ska ett fysikalisk-kemiskt experiment utföras för att kontrollera huruvida testämnet elimineras genom abiotiska mekanismer, t.ex. hydrolys eller adsorption. Ett fysikalisk-kemiskt kontrolltest kan utföras genom tillsats av kvicksilver(II)klorid ($HgCl_2$) ([6]) (50–100 mg/l) i två kolvar med testämne i syfte att hejda den mikrobiella aktiviteten. En betydande minskning av det särskilda ämnets koncentration under testets gång visar på abiotiska elimineringsmekanismer.

Antal BOD-kolvar i en typisk testomgång

29. I en typisk testomgång används följande antal kolvar:

— minst 8 som innehåller testämne,

— minst 8 som endast innehåller näringsmättat havsvatten,

— minst 8 som innehåller referensämne, och, vid behov,

— 6 kolvar som innehåller test- och referensämnen (toxicitetskontroll).

FÖRFARANDE

30. Tappa efter beredningen omedelbart upp varje lösning med en hävert från den nedersta fjärdedelen (inte från botten) av de stora kolvarna för att fylla respektive grupp med BOD-kolvar. Analysera omedelbart nollkontrollerna (tid: noll) med avseende på löst syre (punkt 33) eller bevara dem för senare kemisk analys genom utfällning med $MnCl_2$ (mangan(II)klorid) och NaOH (natriumhydroxid).

([6]) Kvicksilver(II)klorid ($HgCl_2$) är ett mycket giftigt ämne som bör hanteras med lämpliga försiktighetsåtgärder. Vattenhaltigt avfall som innehåller denna kemikalie bör bortskaffas på lämpligt sätt. Det bör inte släppas ut i avloppssystemet.

▼M6

31. Inkubera återstående parallella BOD-kolvar vid testtemperaturen (15–20 °C), förvara dem mörkt och avlägsna dem från inkubationsområdet vid lämpliga tidsintervall (t.ex. efter 5, 15 och 28 dagar som ett minimum) och analysera dem med avseende på löst syre (punkt 33).

32. Membranfiltrera (0,2–0,45 μm) eller centrifugera i 15 minuter proven för särskilda analyser (frivilligt). Lagra i upp till 48 timmar vid 2–4 °C eller under längre tid vid -18 °C om de inte analyseras omedelbart (om det är känt att testämnet förblir oförändrat, surgör innehållet till pH 2 före lagring).

Bestämning av löst syre

33. Bestäm koncentrationen av det upplösta syret med hjälp av kemiska eller elektrokemiska metoder som erkänts på nationell eller internationell nivå.

DATA OCH RAPPORTERING

Behandling av resultaten

34. Registrera analysresultaten på de bifogade resultatformulären (tillägg 5).

35. Beräkna BOD som skillnaden mellan syreförlusten i ett blankprov och en testämneslösning under testbetingelserna. Dividera nettosyreförlusten med ämnets koncentration (w/v) för att uttrycka BOD som mg BOD/mg testämne. Nedbrytningen definieras som förhållandet mellan den biokemiska syreförbrukningen och antingen, företrädesvis, den teoretiska syreförbrukningen (ThOD) eller den kemiska syreförbrukningen (COD) uttryckt i procent (se punkt 36).

36. Beräkna bionedbrytningsvärden för varje provtagningstillfälle för både test- och referensämnen med någon av följande ekvationer:

$$\%\ bionedbrytning = \frac{mg\ O_2/mg\ testat\ ämne}{mg\ ThOD/mg\ testat\ ämne} \times 100$$

$$\%\ bionedbrytning = \frac{mg\ O_2/mg\ testat\ ämne}{mg\ COD/mg\ testat\ ämne} \times 100$$

där

ThOD = teoretisk syreförbrukning (beräkning, tillägg 3)

COD = kemisk syreförbrukning, bestäms på experimentell väg.

Anmärkning: Ibland får man olika resultat med de två beräkningsmetoderna (procent av ThOD eller procent av COD). Det bästa är att använda ThOD, eftersom en del ämnen inte oxideras helt i COD-testet.

37. Illustrera nedbrytningstestets förlopp grafiskt i ett diagram (se exempel i avsnittet ”Resultatens giltighet och deras tolkning”. Om det finns tillräckliga data bör man utifrån bionedbrytningskurvan beräkna lagfasen (t_L) och den tid som krävs för att nå 50 procents eliminering från lagfasens slut (t_{50}).

38. Om en särskild analys har utförts (valfritt) ska procentandelen primär nedbrytning anges som procentandelen av det särskilda ämne som har eliminerats inom testperioden (korrigerat för analytiska blankprov).

▼M6

Testrapport

39. Testrapporten måste innehålla följande information:

Testämne:

— fysikalisk form och, när så är tillämpligt, fysikalisk-kemiska egenskaper,

— identifikationsuppgifter.

Testbetingelser:

— beskrivning av provtagningsstället och dess läge: förorenings- och näringsstatus (koloniräkning, nitrat, ammonium, fosfat i tillämpliga fall),

— beskrivning av provet (datum för provtagning, djup, utseende, temperatur, salthalt, DOC (frivillig uppgift), tid mellan provtagningen och användning i testet),

— metod som används (i förekommande fall) för åldrande av havsvatten,

— metod som används för förbehandling (filtrering/sedimentering) av havsvattnet,

— metod som används för bestämning av COD (om detta utförts),

— metod som används för syremätningar,

— dispergeringsförfarande för ämnen som är svårlösliga under försöksbetingelserna,

— metod som används för att fastställa antalet heterotrofer i havsvattnet (platträkning eller alternativt förfarande),

— metod för bestämning av DOC i havsvatten (frivillig uppgift),

— metod som används för särskild analys (frivillig uppgift),

— andra metoder som används för att karakterisera havsvattnet (mätning av ATP-halten osv.).

Resultat:

— analysdata som rapporteras på ett resultatformulär (se bifogat exempel, tillägg 5),

— nedbrytningstestets förlopp representerat grafiskt i ett diagram som visar lagfasen (t_L), lutningen och den tid det tar (från lagfasens slut) för att nå 50 procent av den slutliga syreupptagningen som orsakas av oxidering av testämnet (t_{50}). Lagfasen kan uppskattas grafiskt såsom visas i den bifogade figuren, eller kan lämpligen antas vara den tid som krävs för 10 procents nedbrytning,

— procent nedbrytning mätt efter 28 dagar.

Diskussion av resultaten.

Resultatens giltighet och deras tolkning

40. Respirationen i blankprovet bör inte överstiga 30 procent av syrehalten i testkolven. Om det inte är möjligt att uppfylla detta kriterium med nyligen insamlat havsvatten måste havsvattnet åldras (stabiliseras) före användning.

41. Man bör beakta möjligheten att ämnen som innehåller kväve kan påverka resultaten.

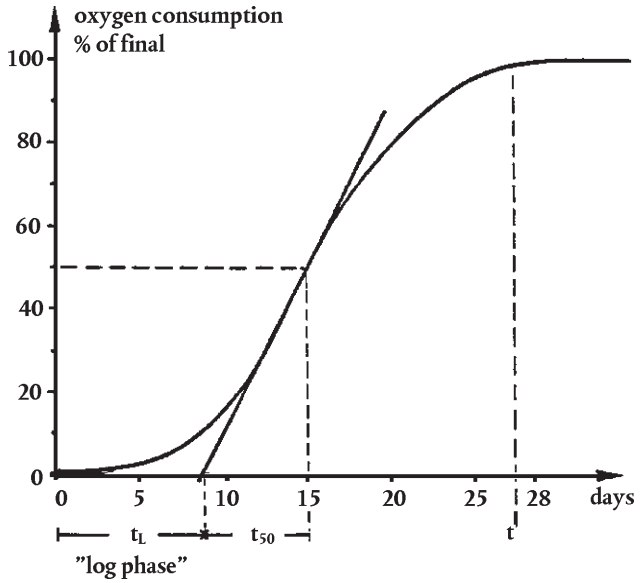
▼M6

42. Resultat som erhållits med referensämnena natriumbensoat och anilin bör vara jämförbara med de resultat som uppnåddes i ringtestet (3) (punkt 9). Om de resultat som erhållits med referensämnen är atypiska bör testet upprepas med ett annat havsvattenprov.

43. Testämnet kan anses vara bakteriehämmande (vid den koncentration som används) om BOD för blandningen av referens- och testämnen är mindre än summan av BOD för de separata lösningarna av dessa två ämnen.

44. På grund av de relativt höga testkoncentrationer som används jämfört med de koncentrationer som förekommer i de flesta naturliga system (och följaktligen ett ogynnsamt förhållande mellan testämnets och andra kolkällors koncentrationer) bör metoden betraktas som ett preliminärt test som kan användas för att ge en antydan om huruvida ett ämne är lätt biologiskt nedbrytbart. Ett lågt resultat behöver därför inte nödvändigtvis betyda att testämnet inte är bionedbrytbart i marina miljöer, men visar att det krävs mer arbete för att detta förhållande ska kunna fastställas.

Ett exempel på ett teoretiskt nedbrytningsförsök som illustrerar ett möjligt sätt att uppskatta värdena för t_L (lagfasens längd) och t_{50}, det tidsintervall (med början vid t_L) som krävs för att uppnå 50 % av den slutliga syreupptagningen orsakad av oxidering av testämnet, återges nedan:



LITTERATUR

(1) de Kreuk J. F. och Hanstveit A. O. (1981). Determination of the biodegradability of the organic fraction of chemical wastes. Chemosphere, 10 (6); 561–573.

(2) Kapitel C.4-B i denna bilaga: Bestämning av ”lätt” bionedbrytbarhet, del III: modifierat OECD-screeningtest

(3) Nyholm N. och Kristensen P. (1987). Screening Test Methods for Assessment of Biodegradability of Chemical Substances in Seawater. Slutrapport från ringtestprogrammet 1984–1985, mars 1987, Europeiska kommissionen.

(4) Kapitel C.11 i denna bilaga: Biologisk nedbrytbarhet – Aktiverat slam – respirationshämningstest.

(5) Kapitel C.4-E i denna bilaga: Bestämning av ”lätt” bionedbrytbarhet, del VI. Closed bottle-test.

▼M6

Tillägg 1

Bestämning av organiskt kol i havsvatten

SKAKKOLVMETODEN

För bestämning av det organiska kolet i ett vattenprov oxideras de organiska föreningarna i provet till koldioxid, i allmänhet med hjälp av en av följande tre tekniker:

— våtoxidation av persulfat/UV-strålning,

— våtoxidation av persulfat/förhöjd temperatur (116–130 °C),

— förbränning.

Utvecklad CO_2 kvantifieras med hjälp av infraröd spektrometri eller titrering. Alternativt kan CO_2 reduceras till metan, som kvantifieras med en flamjoniseringsdetektor (FID).

Persulfat/UV-metoden används vanligen för analys av ”rent” vatten med låg halt av partiklar. De senare två metoderna kan användas för de flesta typer av vattenprover. Persulfat/förhöjd temperatur-oxidation är den mest lämpliga metoden för prov med låga nivåer och förbränningstekniken kan tillämpas på prov som har en halt av icke-flyktigt organiskt kol (NVOC) som ligger långt över 1 mg C/l.

Störningar

Alla tre metoderna är beroende av att man eliminerar eller kompenserar för oorganiskt kol (IC) som finns i provet. Avgasning av koldioxid från det surgjorda provet är den vanligaste metoden för att eliminera det oorganiska kolet, även om detta också leder till en förlust av flyktiga organiska föreningar (1). En fullständig eliminering eller kompensation för oorganiskt kol måste garanteras för varje provmatris, och det flyktiga organiska kolet (VOC) måste bestämmas utöver NVOC beroende på provtypen.

Höga koncentrationer av klorid leder till minskad oxidationseffektivitet när man använder persulfat/UV-metoden (2). Genom användning av ett oxidationsreagens som modifierats genom tillsats av kvicksilver(II)nitrat kan man dock avlägsna denna störning. Det rekommenderas att den högsta tillåtliga provvolymen används för att utvärdera varje typ av kloridhaltigt prov. Höga saltkoncentrationer i prov som analyserats med förbränningsmetoden kan orsaka saltbeläggning på katalysatorn och kraftig korrosion av förbränningsröret. Åtgärder bör vidtas enligt tillverkarens anvisningar.

Mycket grumliga prover och prover som innehåller partiklar kan oxideras ofullständigt när man använder persulfat/UV-metoden.

Exempel på en lämplig metod

Icke-flyktigt organiskt kol bestäms genom oxidation med persulfat/UV-strålning och därpå följande kvantifiering av utvecklad CO_2 med hjälp av icke-dispersiv infraröd spektroskopi.

Oxidationsreagenset modifieras i enlighet med de förslag som anges i (2) på de sätt som beskrivs i tillverkarens manual:

a) 8,2 g $HgCl_2$ och 9,6 g $Hg(NO_3)_2 \cdot H_2O$ löses upp i flera hundra milliliter reagensvatten med låg kolhalt.

b) 20 g $K_2S_2O_8$ löses upp i den kvicksilverhaltiga saltlösningen.

▼M6

c) 5 ml HNO_3 (konc.) tillsätts till blandningen.

d) reagenset späds ut till 1 000 ml.

Störningen från klorid avlägsnas om man använder 40 µl provvolym för 10 procent klorid och 200 µl provvolym för 1,9 procent klorid. Prover med höga kloridkoncentrationer och/eller större provvolymer kan analyseras enligt denna metod förutsatt att man förhindrar att klorid ackumuleras i oxidationskärlet. Bestämningen av flyktigt organiskt kol kan därefter utföras, om det är relevant för provtypen i fråga.

LITTERATUR

(1) ISO, Water quality – determination of total organic carbon. Draft International Standard ISO/DIS 8245, 16 januari 1986.

(2) American Public Health Association, Standard Methods for the Estimation of Water and Wastewater. American Water Works Association & Water Pollution Control Federation, 16:e upplagan, 1985.

Också av intresse (ger en beskrivning av ett autoanalyssystem):

(3) Schreurs W. (1978). An automated colorimetric method for the determination of dissolved organic carbon in seawater by UV destruction. Hydrobiological Bulletin 12, 137–142.

▼M6

Tillägg 2

Biologisk nedbrytning i havsvatten

SKAKKOLVMETODEN

RESULTATFORMULÄR

1. **LABORATORIUM:**

2. **DATUM FÖR INLEDNING AV TESTET:**

3. **TESTÄMNE:**

Namn:

Stamlösningens koncentration: mg/l som ämne

Startkoncentration i mediet, t_0: mg/l som ämne

: mg DOC/l

4. **HAVSVATTEN:**

Källa:

Insamlingsdatum:

Provtagningsdjup:

Utseende vid insamlingstillfället (t.ex. grumligt, etc.):

Salthalt vid insamlingen: ‰

Temperatur vid insamlingen: °C

DOC ”x” timmar efter insamlingen: mg/l

Förbehandling före testning (t.ex. filtrering, sedimentering, åldrande, etc.):

Räkning av kolonier av mikroorganismer — ursprungligt prov: kolonier/ml

— vid testets inledning: kolonier/ml

Andra egenskaper:

5. **KOLBESTÄMNINGAR:**

Kolanalysator:

	Kolv nr		DOC efter n dagar (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Test: näringsmättat havsvatten med testämne	1	a_1					
		a_2					
		medelvärdet, $C_{a(t)}$					
	2	b_1					
		b_2					
		medelvärdet, $C_{b(t)}$					

▼M6

	Kolv nr		DOC efter n dagar (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Blankprov: näringsmättat havsvatten utan testämne	1	c_1					
		c_2					
		medelvärdet, $C_{c(t)}$					
	2	d_1					
		d_2					
		medelvärdet, $C_{d(t)}$					
	medelvärdet, $C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. **UTVÄRDERING AV RÅDATA:**

Kolv nr	Beräkning av resultaten	% nedbrytning efter n dagar				
		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				
Medelvärde (*)	$D_t = \frac{D_1 + D_2}{2}$	0				

(*) Genomsnittet av D_1 och D_2 ska inte beräknas om det föreligger en betydande skillnad mellan de två värdena.

Anmärkning: Liknande format kan användas när nedbrytningen följs av särskild analys, och för referensämnet och toxicitetskontrollproverna.

7. **ABIOTISK NEDBRYTNING (valfritt)**

	Tid (dagar)	
	0	t
DOC-koncentration (mg/l) i steril kontroll	$C_{s(o)}$	$C_{s(t)}$

$$\% \text{ abiotisk nedbrytning} = \frac{C_{s(0)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

▼**M6**

Tillägg 3

Beräkning av den teoretiska biokemiska syreförbrukningen

CLOSED BOTTLE-METODEN

ThOD för ämnet $C_cH_hCl_{cl}N_nNa_{na}O_oP_pS_s$ med molekylvikten MW beräknas enligt följande:

$$ThOD_{NH3} = \frac{16\left[2c + \frac{1}{2}(h - cl - 3n) + 3s + \frac{5}{2^p} + \frac{1}{2^{na}} - o\right]}{MW}$$

Denna beräkning tyder på att C mineraliseras till CO_2, H till H_2O, P till P_2O_5 och Na till Na_2O. Halogen elimineras som vätehalid och kväve som ammoniak.

Exempel:

Glukos $C_6H_{12}O_6$, MW = 180

$$ThOD = \frac{16\left(2 \times 6 + \frac{1}{2} \times 12 - 6\right)}{180} = 1{,}07 \ \ mg\ O_2/mg\ glukos$$

Molekylvikten av salter annat än alkalimetaller beräknas med antagandet att salterna har hydrolyserats.

Svavel antas oxideras till oxidationstillståndet +6.

Exempel:

Natrium n-dodekylbensensulfonat $C_{18}H_{29}SO_3Na$, MW = 348

$$ThOD = \frac{16\left(36 + \frac{29}{2} + 3 + \frac{1}{2} - 3\right)}{348} = 2{,}34 \ \ mg\ O_2/mg\ ämne$$

När det gäller kvävehaltiga ämnen kan kvävet elimineras som ammoniak, nitrit eller nitrat, motsvarande olika teoretiska biokemiska syreförbrukningar.

$$ThOD_{NO2} = \frac{16\left[2c + \frac{1}{2}(h - cl) + 3s + \frac{3}{2^n} + \frac{5}{2_p} + \frac{1}{2^{na}} - o\right]}{MW}$$

$$ThOD_{NO3} = \frac{16\left[2c + \frac{1}{2}(h - cl) + 3s + \frac{5}{2^n} + \frac{5}{2^p} + \frac{1}{2^{na}} - o\right]}{MW}$$

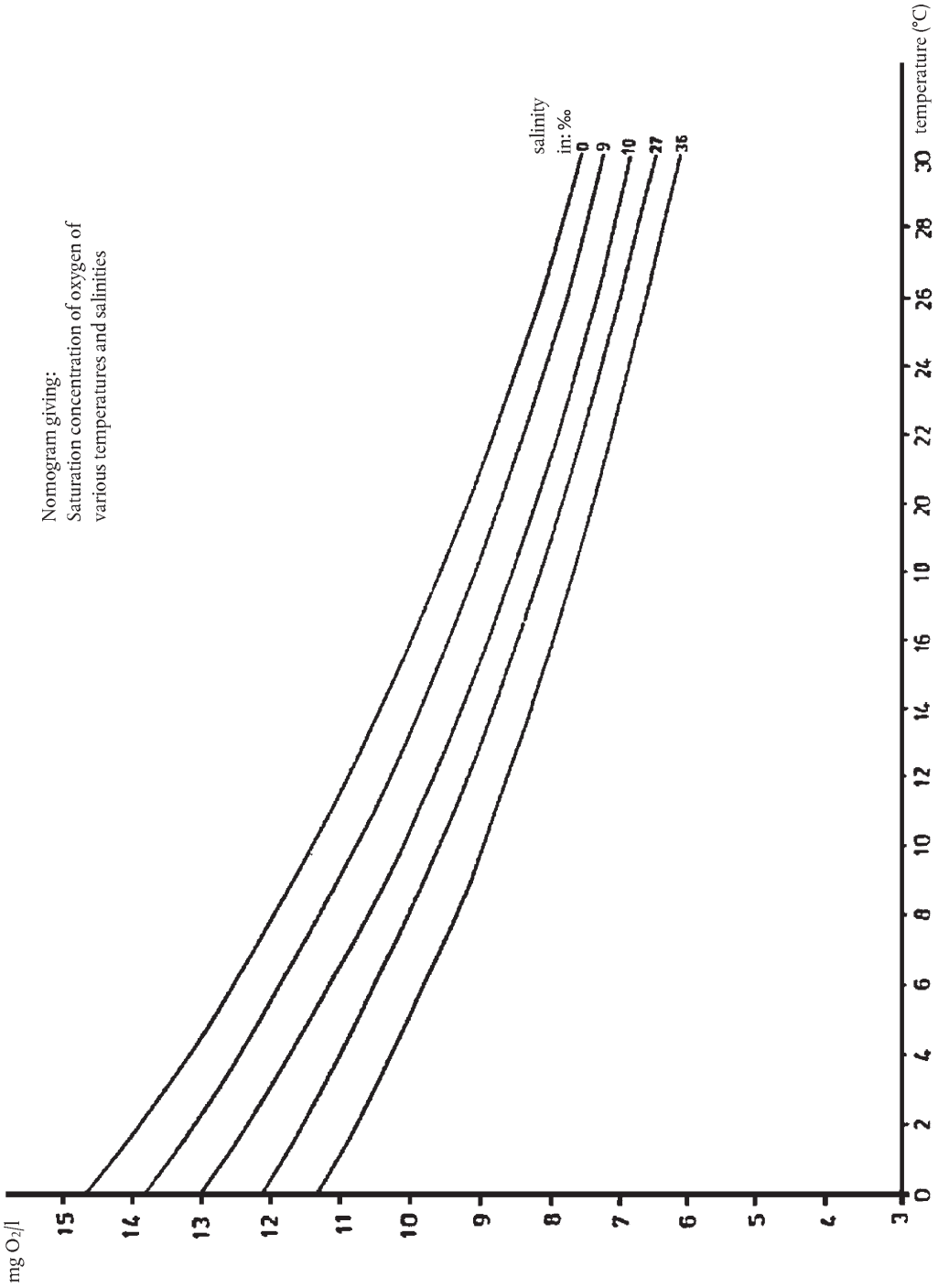
Anta när det gäller en sekundär amin att fullständig nitratbildning har iakttagits genom analys:

$(C_{12}H_{25})_2$ NH, MW = 353

$$ThOD_{NO3} = \frac{16\left(48 + \frac{51}{2} + \frac{5}{2}\right)}{353} = 3{,}44 \ \ mg\ O_2/mg\ ämne$$

▼**M6**

Tillägg 4


Nomogram giving:
Saturation concentration of oxygen of various temperatures and salinities
salinity in: ‰
0
9
10
27
36
temperature (°C)
mg O2/l

▼M6

Tillägg 5

Biologisk nedbrytning i havsvatten

CLOSED BOTTLE-METODEN

RESULTATFORMULÄR

1. **LABORATORIUM:**

2. **DATUM FÖR INLEDNING AV TESTET:**

3. **TESTÄMNE:**

Namn:

Stamlösningens koncentration:	mg/l
Startkoncentration i havsvattenmediet:	mg/l
ThOD eller COD:	mg O_2/mg testämne

4. **HAVSVATTEN:**

Källa:

Insamlingsdatum:

Provtagningsdjup:

Utseende vid insamlingstillfället (t.ex. grumligt, etc.):

Salthalt vid insamlingen:	‰
Temperatur vid insamlingen:	°C
DOC ”x” timmar efter insamlingen:	mg/l

Förbehandling före testning (t.ex. filtrering, sedimentering, åldrande osv.):

Räkning av kolonier av mikroorganismer	— ursprungligt prov:	kolonier/ml
	— vid testets inledning:	kolonier/ml

Andra egenskaper:

5. **TESTMEDIUM:**

Temperatur efter luftningen:	°C
O_2-koncentration efter luftningen och vilan före testets inledning:	mg O_2/l

6. **BESTÄMNING AV LÖST SYRE:**

Metod: Winkler/elektrod

	Kolv nr		mg O_2/l efter n dagar			
			0	5	15	28
Test: näringsmättat havsvatten med testämne	1	a_1				
	2	a_2				
	Medelvärde för testämnesprovet	$m_t = \frac{a_1 + a_2}{2}$				

▼M6

	Kolv nr		mg O_2/l efter n dagar			
			0	5	15	28
Blankprov: näringsmättat havsvatten utan testämne	1	c_1				
	2	c_2				
	Medelvärde för blankprovet	$m_b = \frac{c_1 + c_2}{2}$				

Anmärkning: en motsvarande uppställning kan användas för referensämnes- och toxicitetskontrollproverna.

7. **FÖRLUST AV LÖST SYRE: % NEDBRYTNING (%D):**

	Förlust av löst syre efter n dagar		
	5	15	28
$(m_b - m_t)$ (1)			
$\%D = \frac{(m_b - m_t)(1)}{testämne\ (mg/l) \times ThOD} \times 100$			

(1) Detta förutsätter att $m_{b(o)} = m_{t(o)}$, där
$m_{b(o)}$ = värde för blankprovet på dag 0,
$m_{t(o)}$ = värde för testämnet på dag 0.
Om $m_{b(o)}$ inte är lika med $m_{t(o)}$ använder man $(m_{t(o)} - m_{t(x)}) - (m_{b(o)} - m_{b(x)})$, där
$m_{b(x)}$ = värde för blankprovet på dag x,
$m_{t(x)}$ = värde för testämnet på dag x.

▼M6

C.43 ANAEROB BIOLOGISK NEDBRYTBARHET AV ORGANISKA ÄMNEN I RÖTSLAM: GENOM MÄTNING AV GASPRODUKTIONEN

INLEDNING

1. Denna testmetod motsvarar OECD:s testriktlinje (TG) 311 (2006). Det finns ett antal screeningtester för bedömning av aerob bionedbrytbarhet av organiska ämnen (testmetoderna C.4, C.9, C.10 och C.11 (1) och OECD TG 302C (2)), och resultaten från tillämpningen av dessa har framgångsrikt använts för att förutsäga omvandlingen, spridningen och nedbrytningen av ämnen i den aeroba miljön, särskilt i de aeroba stadierna av reningen av avloppsvatten. Olika delar av icke vattenlösliga ämnen, såväl som ämnen som adsorberas på fasta ämnen i avloppsvatten, behandlas också aerobt eftersom de ingår i sedimenterat spillvatten. De större delarna av dessa ämnen är dock bundna till det primära sedimenterade slammet, som separeras från orenat avloppsvatten i sedimenteringsbassänger innan det sedimenterade avloppsvattnet, eller supernatanten, behandlas aerobt. Slammet, som innehåller vissa av de lösliga ämnena i den interstitiella vätskan, överförs därefter till uppvärmda rötkammare för anaerob behandling. Ännu finns det inga tester i denna serie för bedömning av anaerob bionedbrytbarhet i anaeroba rötkammare och detta test är avsett att fylla denna lucka. Det är inte nödvändigtvis tillämpbart på andra anoxa miljökammare.

2. Respirometriska metoder för att mäta de mängder gas som bildas, huvudsakligen metan (CH_4) och koldioxid (CO_2), under anaeroba förhållanden har med framgång använts för att bedöma den anaeroba nedbrytbarheten. Birch m.fl. (3) granskade dessa förfaranden och konstaterade att Shelton och Tiedjes artikel (4), som bygger på tidigare undersökningar (5) (6) (7), var den mest omfattande. Metoden (4), som vidareutvecklades av andra (8) och har blivit den amerikanska normen (9) (10), löste inte problemen rörande de olika lösligheterna för CO_2 och CH_4 i testmediet och beräkningen av testämnets teoretiska gasproduktion. I ECETOC:s rapport (3) rekommenderades ytterligare mätning av halten löst oorganiskt kol i supernatanten, vilket gjorde tekniken mer allmänt tillämpbar. ECETOC-metoden genomgick ett internationellt kalibreringstest (eller ringtest) och blev ISO-standarden ISO 11734 (11).

3. Denna testmetod, som bygger på ISO 11734 (11), beskriver en screeningmetod för utvärdering av den potentiella anaeroba bionedbrytbarheten för organiska ämnen under särskilda förhållanden (dvs. i en anaerob rötkammare vid en viss tidpunkt och med ett visst koncentrationsintervall med mikroorganismer). Eftersom man använder utspätt slam med relativt hög koncentration av testämnet och testtiden normalt är längre än retentionstiden i anaeroba rötkammare, motsvarar testförhållandena inte nödvändigtvis förhållandena i anaeroba rötkammare, och inte heller kan testet användas för bedömning av anaerob bionedbrytbarhet för organiska ämnen under olika miljöförhållanden. Slam exponeras för testämnet i upp till 60 dagar, vilket är längre än den normala retentionstiden (25–30 dagar) i anaeroba rötkammare, men när det gäller industriavloppsvatten kan retentionstiderna vara mycket längre. Prognoser utifrån resultaten av detta test kan inte göras på ett lika övertygande sätt som när det gäller aerob bionedbrytbarhet. Det har framkommit tillräckliga bevis på hur testämnen reagerar i ”lätta” aeroba tester och i simuleringstester i aerob miljö för att man ska kunna vara säker på att det finns en förbindelse, men det finns endast ett fåtal liknande bevis för den anaeroba miljön. Fullständig biologisk nedbrytbarhet i anaerob miljö

▼M6

kan antas förekomma om 75–80 % av den teoretiska gasproduktionen uppnås. De höga proportionerna för ämnet jämfört med den biomassa som används i dessa tester innebär att ett ämne som klarar testet är mer benäget att brytas ned i en anaerob rötkammare. Det är inte nödvändigtvis så att ämnen som inte omvandlas till gas i testet består vid mer miljömässigt realistiska förhållanden mellan ämne och biomassa. Även andra anaeroba reaktioner förkommer som åtminstone delvis bryter ner ämnen, t.ex. avklorering, men i detta test påvisas inga sådana reaktioner. Genom tillämpning av särskilda analysmetoder för bestämning av testämnet kan dess eliminering dock kartläggas (se punkterna 6, 30, 44 och 53).

PRINCIP FÖR TESTMETODEN

4. Tvättat rötslam ([9]) som innehåller låga (< 10 mg/l) koncentrationer av oorganiskt kol (IC), späds cirka tio gånger till en koncentration av fasta ämnen på 1 g/l till 3 g/l totalt och inkuberas vid 35 ± 2 °C i slutna kärl med 20–100 mg C/l av testämnet i upp till 60 dagar. Man bör räkna med att mäta aktiviteten i slammet genom att köra parallella blankkontrollprov med slam som inokulat i mediet men utan testämne.

5. Ökningen av trycket i gasutrymmet i kärlen på grund av produktionen av koldioxid och metan mäts. Mycket av den CO_2 som bildas kommer att upplösas i vätskefasen eller omvandlas till karbonat eller vätekarbonat under testförhållandena. Detta oorganiska kol mäts i slutet av testet.

6. Mängden kol (oorganiskt kol plus metan) som uppkommer till följd av biologisk nedbrytning av testämnet beräknas utifrån nettogasproduktionen och nettobildningen av oorganiskt kol i vätskefasen utöver värdena från blankprovet. Den biologiska nedbrytningens omfattning beräknas utifrån den totala mängden oorganiskt kol och metan-C som bildas som en procentandel av den uppmätta eller beräknade mängden kol som tillsatts som testämne. Den biologiska nedbrytningens förlopp kan följas genom att man tar mellanliggande mätningar endast av gasproduktionen. Dessutom kan den primära biologiska nedbrytningen fastställas genom särskilda analyser i början och i slutet av testet.

INFORMATION OM TESTÄMNET

7. Testkemikaliens renhet, vattenlöslighet, flyktighet och adsorption ska vara kända för att möjliggöra en korrekt tolkning av resultaten. Halten av organiskt kol (% w/w) i testämnet måste vara känd, antingen från den kemiska strukturen eller genom mätning. För flyktiga testämnen kan en uppmätt eller beräknad Henrys lags konstant användas för att avgöra huruvida testet är tillämpligt. Information om testämnets toxicitet för anaeroba bakterier är till hjälp vid valet av en lämplig testkoncentration och för tolkning av de resultat som påvisar dålig nedbrytbarhet. Det rekommenderas att man inkluderar hämningskontrollen såvida det inte är känt att testämnet inte hämmar den anaeroba mikrobiella aktiviteten (se punkt 21 och ISO 13641-1 (12)).

([9]) Rötslam är en blandning av sedimenterade faser av spillvatten och aktiverat slam som har inkuberats i en anaerob rötkammare vid ungefär 35 °C för att minska biomassan och problemen med dålig lukt samt för att förbättra slammets avvattningsförmåga. Det består av en förening av anaeroba fermenterande och metanogena bakterier som producerar koldioxid och metan (11).

▼M6

TESTMETODENS TILLÄMPBARHET

8. Testmetoden kan tillämpas på vattenlösliga ämnen, och även på dåligt lösliga och olösliga ämnen förutsatt att en exakt doseringsmetod används (t.ex. ISO 10634) (13). I allmänhet behöver ett beslut fattas från fall till fall för flyktiga ämnen. Särskilda åtgärder kan behöva vidtas, t.ex. att inte släppa ut gas under testets gång.

REFERENSÄMNEN

9. För att kontrollera förfarandet testas ett referensämne genom att man inrättar lämpliga kärl i två exemplar som en del av de normala provomgångarna. Fenol, natriumbensoat och polyetylenglykol 400 är exempel på referensämnen som kan förväntas brytas ner med mer än 60 % av den teoretiska gasproduktionen (dvs. metan och oorganiskt kol) inom 60 dagar (3) (14).

TESTRESULTATENS REPRODUCERBARHET

10. I ett internationellt ringtest (14) befanns det vara god reproducerbarhet i mätningarna av gastrycket mellan tredubbla kärl. Den relativa standardavvikelsen (variationskoefficienten, COV) var i regel under 20 %, även om detta värde ofta ökade till > 20 % vid förekomsten av toxiska ämnen eller mot slutet av inkubationstiden på 60 dagar. Högre avvikelser konstaterades även i kärl med en volym på < 150 ml. De slutliga pH-värdena i testmediet låg i intervallet 6,5–7,0.

11. Följande resultat erhölls i ringtestet.

Testämne	Totala data n_1	Medelvärde för nedbryt-ningen (av totala data) (%)	Relativ standard-avvikelse (av totala data) (%)	Giltiga data n_2	Medelvärde för nedbryt-ningen (av giltiga data) (%)	Relativ stan-dard-avvi-kelse (av giltiga data) (%)	Data > 60 % nedbryt-ning i giltiga prov n_3
Palmitinsyra	36	68,7 ± 30,7	45	27	72,2 ± 18,8	26	19 = 70 % (*)
Polyetylen-glykol 400	38	79,8 ± 28,0	35	29	77,7 ± 17,8	23	24 = 83 % (*)

(*) Andel av n_2

12. Variationskoefficienterna för medelvärdet för alla värden som erhölls med palmitinsyra och polyetylenglykol 400 var så höga som 45 % (n = 36) respektive 35 % (n = 38). När värden < 40 % och > 100 % utelämnades (de förstnämnda antogs bero på suboptimala betingelser, de senare på okända skäl), minskade variationskoefficienterna till 26 % respektive 23 %. Andelen giltiga värden som uppnådde minst 60 % nedbrytning var 70 % för palmitinsyra och 83 % för polyetylenglykol 400. Andelen av den procentuella bionedbrytningen som härrörde från mätningar av löst oorganiskt kol var relativt låg men varierande. För palmitinsyra var intervallet 0–35 % och medelvärdet 12 % med en variationskoefficient på 92 %, och för polyetylenglykol 400 var intervallet 0–40 % och medelvärdet 24 %, med en variationskoefficient på 54 %.

BESKRIVNING AV TESTMETODEN

Utrustning

13. Vanlig laboratorieutrustning samt följande krävs:

a. Inkubator – gnistsäker och inställd på 35 ± 2 °C.

▼M6

b. Trycksäkra testkärl av glas av lämplig nominell storlek ([11]), som vart och ett är försett med ett gastätt septum som tål cirka 2 bar. Gasutrymmet bör vara ungefär 10 % till 30 % av den totala volymen. Om biogas släpps ut regelbundet är det lämpligt med ca 10 % gasutrymmesvolym, men om gasen endast släpps ut vid slutet av testet är det lämpligt med 30 %. Injektionsflaskor av glas med en nominell volym på 125 ml och en faktisk volym på cirka 160 ml, förseglade med ampullpackningar ([12]) och aluminiumringar, rekommenderas när trycket släpps ut vid varje provtagningstidpunkt.

c. Tryckmätningsanordning ([13]) anpassad för att möjliggöra mätning och avluftning av den gas som bildas, till exempel en handhållen precisionstryckmätare ansluten till en lämplig kanyl. En gastät trevägsventil underlättar utsläpp av övertryck (tillägg 1). Den inre volymen hos tryckomvandlarens slang och ventil måste vara så låg som möjligt så att de fel som uppkommer när man underlåter att beakta utrustningens volym är obetydliga.

Obs! Tryckavläsningarna används direkt för att beräkna den mängd koldioxid som bildas i gasutrymmet (punkterna 42–44). Alternativt kan tryckavläsningarna omvandlas till volym (vid 35 °C, atmosfärstryck) gas som bildats med hjälp av ett omvandlingsdiagram. Detta diagram har framställts utifrån data som erhållits genom att injicera kända volymer kväve i en serie testkärl (t.ex. injektionsflaskor) vid 35 ± 2 °C och registrera de stabiliserade tryckavläsningar som erhållits (se tillägg 2). Beräkningen visas i anmärkningen i punkt 44.

Varning! Undvik nålstickskador vid användning av mikrosprutor.

d. Kolanalysator, lämplig för direkt bestämning av oorganiskt kol i intervallet 1 mg/l till 200 mg/l.

e. Högprecisionssprutor för gas- och vätskeformiga prover.

f. Magnetomrörare och magnetloppor (frivilligt).

g. Handskbox (rekommenderas).

Reagens

14. Alla reagens som används ska vara av analyskvalitet.

([11]) Den rekommenderade storleken är 0,1 liter till 1 liter.

([12]) Användningen av gastäta silikonseptum rekommenderas. Vidare rekommenderas att lockens gastäthet, i synnerhet butylgummiseptum, provas eftersom flera kommersiellt tillgängliga septum inte är tillräckligt gastäta mot metan och vissa septum inte förblir täta när de genomborras med en nål under testbetingelserna.

([13]) Anordningen bör användas och kalibreras regelbundet enligt tillverkarens anvisningar. Om en tryckmätare av föreskriven kvalitet används, t.ex. inkapslad med ett stålmembran, behövs ingen kalibrering i laboratoriet. Noggrannheten i kalibreringen kan kontrolleras i laboratoriet med en enpunktsmätning vid 1×10^5 Pa mot en tryckmätare med en mekanisk display. När denna punkt mäts korrekt, kommer linjäriteten också att vara oförändrad. Om andra mätinstrument används (utan certifierad kalibrering av tillverkaren), rekommenderas regelbunden omvandling av mätvärdena över hela mätområdet.

▼M6

Vatten

15. Destillerat eller avjonat vatten (som gjorts syrefritt genom bubbling med kvävgas som innehåller mindre än 5 µl/l syre) som innehåller mindre än 2 mg/l löst organiskt kol (DOC).

Testmedium

16. Utspädningsmediet bör beredas med följande beståndsdelar i angivna mängder:

Vattenfritt kaliumdivätefosfat (KH_2PO_4)	0,27 g
Dinatriumvätefosfatdodekahydrat ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$)	1,12 g
Ammoniumklorid (NH_4Cl)	0,53 g
Kalciumkloriddihydrat ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	0,075 g
Magnesiumkloridhexahydrat ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$)	0,10 g
Järn(II)kloridtetrahydrat ($FeCl_2 \cdot 4H_2O$)	0,02 g
Resazurin (syreindikator)	0,001 g
Natriumsulfidnonahydrat ($Na_2S \cdot 9H_2O$)	0,10 g
Stamlösning av spårelement (frivilligt, punkt 18)	10 ml
Tillsätt syrefritt vatten (punkt 15)	till 1 liter

Anmärkning: Man bör använda nyanskaffad natriumsulfid eller så bör den tvättas och torkas före användning för att garantera tillräcklig reduktiv kapacitet. Testet kan utföras utan användning av en handskbox (se punkt 26). I detta fall bör koncentrationen av natriumsulfid i mediet ökas till 0,20 g $Na_2S \cdot 9H_2O$ per liter. Natriumsulfid kan också tillsättas från en lämplig anaerob stamlösning genom det förseglade testkärlets septum eftersom detta förfarande minskar risken för oxidation. Natriumsulfid kan ersättas med titan(III)citrat som tillsätts genom de förseglade testkärlens septum vid en slutlig koncentration på 0,8 till 1,0 mmol/l. Titan(III)citrat är ett mycket effektivt och lågtoxiskt reduktionsmedel som bereds som följer: Lös upp 2,94 g trinatriumcitratdihydrat i 50 ml syrefritt vatten (till dess att man har en lösning på 200 mmol/l) och tillsätt 5 ml 15 % (w/v) titan(III)kloridlösning. Neutralisera till pH 7 ± 0,2 med oorganisk alkali och fördela i ett lämpligt kärl under en ström av kvävgas. Koncentrationen av titan(III)citrat i denna stamlösning är 164 mmol/l.

17. Blanda testmediets komponenter utom reduktionsmedlet (natriumsulfidtitancitrat) oträskyddsmedlet som kan uppnå den angivna upptagningen när den applicerasch låt kvävgas bubbla genom lösningen i ca 20 minuter omedelbart före användning för att avlägsna syret. Tillsätt en lämplig volym nyberedd lösning av reduktionsmedel (beredd i syrefritt vatten) strax före användningen av mediet. Justera pH i mediet vid behov med en utspädd oorganisk syra eller bas till 7 ± 0,2.

▼M6

Stamlösning med spårelement (frivilligt)

18. Det rekommenderas att testmediet bör innehålla följande spårämnen för att förbättra de anaeroba nedbrytningsprocesserna, framför allt om låga inokulatkoncentrationer (t.ex. 1 g/l) används (11).

Mangan(II)kloridtetrahydrat ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$)	50 mg
Borsyra (H_3BO_3)	5 mg
Zinkklorid ($ZnCl_2$)	5 mg
Koppar(II)klorid ($CuCl_2$)	3 mg
Dinatriummolybdatdihydrat ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$)	1 mg
Koboltkloridhexahydrat ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$)	100 mg
Nickelkloridhexahydrat ($NiCl_2 \cdot 6H_2O$)	10 mg
Dinatriumselenit (Na_2SeO_3)	5 mg
Tillsätt syrefritt vatten (punkt 15)	till 1 liter

Testämne

19. Lägg till testämnet som en stamlösning, suspension, emulsion eller direkt som ett fast eller vätskeformigt ämne eller absorberat till ett glasfiberfilter så att koncentrationen blir högst 100 mg/l organiskt kol. Om man använder stamlösningar ska man bereda en lämplig lösning med vatten (punkt 15) (som tidigare gjorts syrefritt genom bubbling med kvävgas) med en sådan koncentration att den tillsatta volymen är mindre än 5 % av reaktionsblandningens totala volym. Justera vid behov stamlösningens pH till pH 7 ± 0,2. För testämnen som inte är tillräckligt lösliga i vatten bör ISO 10634 (13) konsulteras. Om ett lösningsmedel används bereder man en ytterligare kontroll med endast lösningsmedlet tillsatt till det inokulerade mediet. Organiska lösningsmedel som är kända för att hindra metanproduktionen, såsom kloroform och koltetraklorid, bör undvikas.

Obs! Handskas försiktigt med giftiga testämnen och ämnen vars egenskaper inte är kända.

Referensämnen

20. Referensämnen som natriumbensoat, fenol och polyetylenglykol 400 har med framgång använts för att kontrollera förfarandet eftersom de bryts ner biologiskt med mer än 60 % inom 60 dagar. Bered en stamlösning (i syrefritt vatten) med det valda referensämnet på samma sätt som med testämnet och justera vid behov till pH 7 ± 0,2.

Hämningskontroll (villkorligt)

21. För att få information om testämnets toxicitet för anaeroba mikroorganismer för att finna de lämpligaste testkoncentrationerna tillsätter man testämnet och referensämnet till ett kärl som innehåller testmediet (se punkt 16), vart och ett vid samma koncentration som respektive tillsatt koncentration (se punkterna 19 och 20, och se även ISO 13641-1 (12)).

▼M6

Rötslam

22. Samla in rötslam från en rötkammare vid ett reningsverk som huvudsakligen behandlar spillvatten från hushåll. Slammet bör beskrivas fullständigt och dess bakgrundsinformation bör redovisas (se punkt 54). Om man avser att använda ett anpassat inokulat kan man överväga att använda rötslam från ett reningsverk som behandlar industriavloppsvatten. För insamling av slam ska man använda vidhalsade flaskor tillverkade av högdensitetspolyeten eller liknande material som kan vidga sig. Tillsätt slam till ungefär 1 cm under kolvarnas överkant och försegla dem tätt, helst med en säkerhetsventil. Efter transport till laboratoriet kan det insamlade slammet användas direkt eller placeras i en laboratorierötkammare. Släpp ut överskott av biogas genom att försiktigt öppna kolvarna med slam. Alternativt kan laboratorieproducerat anaerobt slam användas som inokulat, men dess aktivitetsspektrum kan vara försämrat.

Varning! Slam som genomgår rötning producerar lättantändliga gaser som utgör brand- och explosionsrisker, och innehåller även potentiellt patogena organismer. Lämpliga försiktighetsåtgärder bör observeras vid hantering av slam. Av säkerhetsskäl ska glasbehållare inte användas för insamling av slam.

23. För att minska bakgrundsproduktionen av gas och minska blankkontrollkärlens påverkan kan förberedande rötbehandling av slammet övervägas. Om slammet måste genomgå en förberedande rötbehandling bör det få röta utan tillsats av näringsämnen eller substrat vid 35 ± 2 °C i upp till sju dagar. Det har konstaterats att förberedande rötbehandling i omkring fem dagar vanligen leder till en optimal minskning av gasproduktionen i blankprovet utan oacceptabla ökningar antingen av lagfasen eller inkubationsperioden under testperioden eller aktivitetsförluster med avseende på ett litet antal av de ämnen som testas.

24. För testämnen som är eller förväntas vara biologiskt svårnedbrytbara bör man överväga att förexponera slammet för testämnet för att erhålla ett inokulat som är bättre anpassat. I ett sådant fall ska testämnet tillsättas till rötslammet vid en koncentration för organiskt kol på 5 mg/l till 20 mg/l och inkuberas i upp till två veckor. Tvätta det förexponerade slammet noggrant före användning (se punkt 25) och ange betingelserna för förexponeringen i testrapporten.

Inokulat

25. Tvätta slammet (se punkterna 22–24) strax före användningen för att minska koncentrationen oorganiskt kol till mindre än 10 mg/l i den slutliga testsuspensionen. Centrifugera slammet i förseglade rör (t.ex. 3 000 g i 5 minuter) och häll ut supernatanten. Blanda upp den resulterande pelleten i ett syrefritt medium (punkterna 16 och 17), centrifugera om suspensionen och häll ut supernatantvätskan. Om halten oorganiskt kol inte har blivit tillräckligt låg kan slammet tvättas högst två gånger till. Detta tycks inte påverka mikroorganismerna negativt. Blanda slutligen upp pelleten i den erforderliga volymen testmedium och fastställ koncentrationen av fasta ämnen totalt (t.ex. ISO 11923 (15)). Den slutliga koncentrationen av fasta ämnen totalt bör vara mellan 1 g/l och 3 g/l (eller ca 10 % av koncentrationen i det outspädda rötslammet). Utför de ovan beskrivna stegen på ett sådant sätt att slammet har så liten kontakt med syret som möjligt (t.ex. genom användning av kväveatmosfär).

▼M6

TESTFÖRFARANDE

26. Utför följande inledande förfaranden med hjälp av metoder som gör att kontakten mellan rötslammet och syret är så liten som möjligt. Det kan till exempel vara nödvändigt att arbeta i en handskbox i en kväveatmosfär och/eller att rena flaskorna med kväve (4).

Beredning av test- och kontrollanalyser

27. Bered minst tredubbla testkärl (se punkt 13-b) för testämnet, blankproverna, referensämnet, hämningskontrollerna (villkorligt) och tryckregleringskamrarna (frivilligt) (se punkterna 7 och 19–21). Ytterligare kärl för utvärdering av den primära bionedbrytningen med hjälp av särskilda analyser för testämnet kan också beredas. Samma uppsättning blankprovskontroller kan användas för flera testämnen i samma test förutsatt att gasutrymmesvolymerna är konsekventa.

28. Bered det utspädda inokulatet innan det tillsätts i kärlen, t.ex. med hjälp av en pipett med stor mynning. Tillsätt alikvoter av väl uppblandat inokulat (punkt 25) så att koncentrationen av fasta ämnen totalt är densamma i alla kärl (mellan 1 g/l och 3 g/l). Tillsätt stamlösningar av test- och referensämnena efter justering av pH till 7 ± 0,2 vid behov. Testämnet och referensämnet bör tillsättas via den lämpligaste tillförselvägen (punkt 19).

29. Testkoncentrationen av organiskt kol bör normalt vara mellan 20 och 100 mg/l (punkt 4). Om testämnet är toxiskt bör testkoncentrationen sänkas till 20 mg C/l, eller ännu mindre om endast den primära bionedbrytningen ska mätas med särskilda analyser. Det bör noteras att testresultatens variabilitet ökar vid lägre testkoncentrationer.

30. I kärlen med blankprov ska man lägga till en motsvarande mängd av bärämnet som används för dosering av testämnet i stället för en stamlösning, suspension eller emulsion. Om testämnet tillsattes med hjälp av glasfiberfilter eller organiska lösningsmedel ska ett filter eller motsvarande volym lösningsmedel som har avdunstat tillsättas till blankproven. Bered ett extra replikat med testämne för mätning av pH-värdet. Justera vid behov pH till 7 ± 0,2 med små mängder utspädd oorganisk syra eller alkali. Samma mängd neutraliserande ämnen bör tillsättas i alla testkärl. Dessa tillsatser bör inte vara nödvändiga eftersom pH-värdet i stamlösningarna med testämnet och referensämnet redan har justerats (se punkterna 19 och 20). Om den primära bionedbrytningen ska mätas bör ett lämpligt prov tas från pH-kontrollkärlet eller från ett ytterligare testkärl, och testämnets koncentration bör mätas med hjälp av särskilda analyser. Belagda magneter kan läggas till i alla kärl om reaktionsblandningarna ska röras om (frivilligt).

31. Se till att den totala mängden vätska V_l och gasutrymmesvolymen V_h är desamma i alla kärl, och notera och registrera värdena för V_l och V_h. Varje kärl ska förseglas med ett gasseptum och överföras från handskboxen (se punkt 26) till inkubatorn (se punkt 13 a).

▼M6

Svårlösliga testämnen

32. Tillsätt vägda mängder av ämnen som är svårlösliga i vatten direkt i de beredda kärlen. När det är nödvändigt att använda ett lösningsmedel (se punkt 19) ska testämneslösningen eller -suspensionen överföras till det tomma kärlet. Låt lösningsmedlet om möjligt avdunsta genom att kväve leds genom kärlen, och tillsätt därefter övriga ingredienser, nämligen utspätt slam (punkt 25) och syrefritt vatten efter behov. En ytterligare kontroll med lösningsmedel bör också beredas (se punkt 19). För andra metoder för tillsats av olösliga ämnen kan man konsultera ISO 10634 (13). Testämnen i flytande form kan tillsättas med en spruta i helt förberedda och förslutna kärl om det kan förväntas att det ursprungliga pH-värdet inte kommer att överstiga 7 ± 1; tillsätt i annat fall testämnet på det sätt som beskrivs ovan (se punkt 19).

Inkubering och mätningar av gastrycket

33. Inkubera de förberedda kärlen vid 35 ± 2 °C i omkring en timme så att jämvikt uppnås, och släpp ut överskottsgasen i den omgivande atmosfären, till exempel genom att skaka varje kärl för sig, föra in tryckmätarens nål (punkt 13 c) genom förseglingen och öppna ventilen till dess att tryckmätaren visar noll. Om trycket i gasutrymmet i detta skede, eller när mellanliggande mätningar görs, är mindre än det atmosfäriska trycket bör kväve införas för att återupprätta det atmosfäriska trycket. Stäng ventilen (se punkt 13 c) och fortsätt inkuberingen i mörker. Se till att alla delar av kärlen förblir vid nedbrytningstemperaturen. Observera kärlen efter inkubering i 24–48 timmar. Kassera kärlen om supernatanten har en markant rosa färg, dvs. om resazurinet (se punkt 16) har ändrat färg, vilket påvisar närvaro av syre (se punkt 50). Små mängder syre kan tolereras av systemet men högre koncentrationer kan allvarligt hämma den anaeroba bionedbrytningens förlopp. Man kan acceptera att ett enstaka kärl ur en uppsättning med tre då och då måste kasseras, men förekomsten av fler fel än så måste föranleda en undersökning av de experimentella förfarandena såväl som en upprepning av testet.

34. Blanda omsorgsfullt innehållet i varje kärl genom omrörning eller skakning i några minuter minst två eller tre gånger per vecka samt precis före varje tryckmätning. Skakningen återuppslammar inokulatet och garanterar att gasen förblir i jämvikt. Alla tryckmätningar bör göras snabbt så att inte temperaturen i testkärlen sänks, vilket leder till felaktiga avläsningar. Medan tryckmätningen utförs bör hela testkärlet, inklusive gasutrymmet, förbli vid rötningstemperaturen. Mät gastrycket, t.ex. genom att föra in kanylen (punkt 13 c) som är kopplad till tryckmätaren genom septumet. Man bör noga se till att inte vatten kommer in i kanylen. Om detta skulle ske ska de våta delarna torkas och kanylen bytas ut mot en ny. Trycket ska mätas i millibar (se punkt 42). Gastrycket i kärlen kan mätas regelbundet, t.ex. varje vecka, och överskottsgasen släpps eventuellt ut i den omgivande atmosfären. Alternativt mäts trycket endast i slutet av testet för att fastställa den mängd biogas som bildats.

35. Det rekommenderas att man gör mellanliggande avläsningar av gastrycket, eftersom tryckökningen ger vägledning om när testet kan avslutas och gör det möjligt att observera de kinetiska värdena (se punkt 6).

▼M6

36. Testet ska normalt avslutas efter en inkuberingstid på 60 dagar förutsatt att bionedbrytningskurvan som har erhållits från tryckmätningarna har nått platåfasen innan dag 60, dvs. den fas i vilken den maximala nedbrytningen har uppnåtts och bionedbrytningskurvan har jämnats ut. Om platåvärdet är mindre än 60 % blir tolkningen problematisk eftersom detta antyder att endast en del av molekylen har brutits ner eller att ett fel har begåtts. Om det vid utgången av den normala inkubationstiden bildas gas men platåfasen uppenbarligen inte har nåtts, bör man överväga att förlänga testet för att kontrollera om platån (> 60 %) kommer att uppnås.

Mätning av oorganiskt kol

37. Vid slutet av testet efter den sista mätningen av gastrycket ska man låta slammet sedimenteras. Öppna varje kärl var för sig och ta omedelbart ett prov för bestämning av koncentrationen (mg/l) oorganiskt kol (IC) i supernatanten. Man bör varken centrifugera eller filtrera supernatantvätskan, eftersom det skulle innebära en oacceptabel förlust av upplöst koldioxid. Om vätskan inte kan analyseras när den insamlas kan den förvaras i en försluten flaska utan gasutrymme och kylas till cirka 4 °C i upp till två dagar. Efter mätningen av halten oorganiskt kol mäts och registreras pH-värdet.

38. Alternativt kan halten oorganiskt kol i supernatanten fastställas indirekt genom frigöringen av upplöst oorganiskt kol som koldioxid, vilket kan mätas i gasutrymmet. Efter den sista mätningen av gastrycket justeras trycket i vart och ett av testkärlen till atmosfäriskt tryck. Surgör innehållet i varje kärl till cirka pH 1 genom tillsats av en koncentrerad oorganisk syra (t.ex. H_2SO_4) genom de slutna kärlens septum. Inkubera de omskakade kärlen vid 35 ± 2 °C i cirka 24 timmar och mät gastrycket som uppstår som en följd av den utvecklade koldioxiden genom att använda tryckmätaren.

39. Gör liknande avläsningar för motsvarande kärl med blankprov och referensämne och, i förekommande fall, hämningskontrollerna (se punkt 21).

40. I vissa fall, särskilt om samma kontrollkärl används för flera testämnen, bör man överväga att göra mellanliggande mätningar av halten oorganiskt kol i test- och kontrollkärlen, beroende på vad som är lämpligt. I detta fall ska ett tillräckligt antal kärl förberedas för alla mellanliggande mätningar. Detta förfarande är att föredra framför att ta alla prov från endast ett kärl. Det senare kan endast göras om den erforderliga volymen för analys av löst oorganiskt kol inte anses vara för hög. Mätningen av löst oorganiskt kol bör göras efter mätningen av gastrycket utan utsläpp av överskottsgas enligt beskrivning nedan:

— Ta en så liten volym av supernatantproverna som möjligt med en spruta genom septumet utan att öppna kärlen och bestäm halten oorganiskt kol i provet.

— Efter provtagningen släpps överskottsgasen ut, eller inte.

— Man bör beakta att även en liten minskning av supernatantens volym (t.ex. ca 1 %) kan ge en betydande ökning av gasens volym i gasutrymmet (V_h).

— Ekvationerna (se punkt 44) korrigeras genom att vid behov öka V_h i ekvation 3.

▼M6

Särskilda analyser

41. Om den primära anaeroba nedbrytningen (se punkt 30) ska bestämmas ska en lämplig mängd prov tas för särskilda analyser i början och i slutet av testet från de kärl som innehåller testämnet. Notera att om detta görs kommer gasutrymmets (V_h) och vätskans (V_l) volymer att ändras, och man måste därför ta hänsyn till detta vid beräkningen av resultaten rörande gasproduktionen. Alternativt kan prover tas för särskilda analyser från ytterligare blandningar som tidigare inrättats för detta syfte (punkt 30).

DATA OCH RAPPORTERING

Behandling av resultaten

42. Av praktiska skäl mäts gastrycket i millibar (1 mbar = 1hPa = 10^2 Pa; 1 Pa = 1 N/m^2), volymen i liter och temperaturen i grader Celsius.

Kol i gasutrymmet

43. Eftersom 1 mol metan och 1 mol koldioxid innehåller 12 g kol var, kan kolets massa i en given volym utvecklad gas uttryckas som

$$m = 12 \times 10^3 \times n \quad \text{Ekvation [1]}$$

där

m = massan kol (mg) i en given mängd utvecklad gas,

12 = relativ atommassa för kol,

n = antal mol gas i den givna volymen.

Om en annan gas än metan eller koldioxid (t.ex. N_2O) bildas i stora mängder bör formeln [1] ändras för att beskriva eventuella effekter av de gaser som bildas.

44. Från gaslagarna kan *n* uttryckas som

$$n = \frac{pV}{RT} \quad \text{Ekvation [2]}$$

där

p = gastrycket (Pascal),

V = gasens volym (m^3),

R = den allmänna gaskonstanten (8,314J/(mol K)),

T = inkubationstemperaturen (Kelvin).

Genom en kombination av ekvationerna [1] och [2] och genom att rationalisera för att ta hänsyn till produktionen av gas i blankkontrollen får man

$$m_h = \frac{12\,000 \times 0,1(\Delta p \cdot V_h)}{RT} \quad \text{Ekvation [3]}$$

där

m_h = nettomassan kol som bildas som gas i gasutrymmet (mg),

Δp = medelvärdet av skillnaden mellan det initiala och det slutliga trycket i testkärlen minus motsvarande medelvärde i blankkärlen (millibar),

▼M6

V_h = gasutrymmets volym i kärlet (l),

0,1 = omvandling både av Newton/m^2 till millibar och m^3 till liter.

Ekvation [4] bör användas för den normala inkuberingstemperaturen på 35 °C (308 K):

$$m_h = 0{,}468(\Delta p \cdot V_h) \qquad \text{Ekvation [4]}$$

Anmärkning: Alternativ volymberäkning. Tryckmätaravläsningarna omvandlas till ml gas som bildats med hjälp av standardkurvan som genereras genom att man plottar den injicerade volymen (ml) mot mätaravläsningen (tillägg 2). Antalet mol (n) gas i gasutrymmet i varje kärl beräknas genom att man dividerar den sammanlagda gasproduktionen (ml) med 25 286 ml/mol, som är den volym som upptas av en mol gas vid 35 °C och normalt atmosfäriskt tryck. Eftersom 1 mol CH_4 och 1 mol CO_2 innehåller 12 g kol var, kan mängden koldioxid (m, mg) i gasutrymmet (m_h) beräknas enligt ekvation [5]:

$$m_h = 12 \times 10^3 \times n \qquad \text{Ekvation [5]}$$

Rationalisera för att ta hänsyn till produktionen av gas i blankkontrollen:

$$m_h = \frac{12\ 000 \times \Delta V}{25\ 286} = 0,475 \Delta V \qquad \text{Ekvation [6]}$$

där

m_h = nettomassan kol som bildas som gas i gasutrymmet (mg),

ΔV = medelvärdet av skillnaden mellan volymen av den gas som bildas i gasutrymmet i testkärlet och i kärlen med blankprov,

25286 = den volym som upptas av 1 mol gas vid 35 °C, 1 atmosfär.

45. Den biologiska nedbrytningens förlopp kan följas genom att man plottar den kumulativa tryckökningen Δp (i millibar) mot tiden, om så är lämpligt. Från denna kurva kan lagfasen (dagar) fastställas och registreras. Lagfasen är tiden mellan testets inledning till dess att en betydande nedbrytning inleds (för exempel, se tillägg 3). Om mellanliggande prov av supernatanten togs och analyserades (se punkterna 40, 46 och 47) kan den sammanlagda mängden kol som bildas (i gas plus i vätska) plottas i stället för endast det sammanlagda trycket.

Kol i vätskan

46. Mängden metan i vätskan kan försummas eftersom man vet att dess löslighet i vatten är mycket låg. Beräkna massan av oorganiskt kol i vätskan i testkärlen med hjälp av ekvation [7]:

$$m_l = C_{net} \times V_l \qquad \text{Ekvation [7]}$$

där

m_l = massan av oorganiskt kol i vätskan (mg),

C_{net} = koncentrationen av oorganiskt kol i testkärlen minus koncentrationen i kontrollerna vid slutet av testet (mg/l),

V_l = vätskans volym i kärlet (l).

▼M6

Den totala massan av gasformigt kol

47. Beräkna den totala massan av gasformigt kol i kärlet med hjälp av ekvation [8]:

$$m_t = m_h + m_l \qquad \text{Ekvation [8]}$$

där

m_t = den totala massan av gasformigt kol (mg).

m_h och m_l definieras som ovan.

Kol i testämnet

48. Beräkna massan kol i testkärlen som härrör från det tillsatta testämnet med hjälp av ekvation [9]:

$$m_v = C_c \times V_l \qquad \text{Ekvation [9]}$$

där

m_v = massan av kol i testämnet (mg).

C_c = koncentrationen av kol i testämnet i testkärlen (mg/l)

V_l = vätskans volym i testkärlet (l).

Den biologiska nedbrytningens omfattning

49. Beräkna den procentuella bionedbrytningen utifrån gasen i gasutrymmet med hjälp av ekvation [10] och den totala procentuella bionedbrytningen med hjälp av ekvation [11]:

$$D_h = (m_h/m_v) \times 100 \qquad \text{Ekvation [10]}$$

$$D_t = (m_t/m_v) \times 100 \qquad \text{Ekvation [11]}$$

där

D_h = biologisk nedbrytbarhet utifrån gasen i gasutrymmet (%).

D_t = den totala biologiska nedbrytningen (%),

m_h, m_v och m_t definieras som ovan.

Den primära bionedbrytningsgraden beräknas från de (frivilliga) mätningarna av koncentrationen av testämnet vid inkuberingens början och slut, med hjälp av ekvation [12]:

$$D_p = (1 - S_e/S_i) \times 100 \qquad \text{Ekvation [12]}$$

där

D_p = primär nedbrytning av testämnet (%),

S_i = testämnets ursprungliga koncentration (mg/l),

S_e = testämnets koncentration i slutet av testet (mg/l).

Om analysmetoden tyder på betydande koncentrationer av testämnet i det oändrade anaeroba slaminokulatet, använd ekvation [13]:

▼M6

$$D_p^{\,1} = [1 - (S_e - S_{eb})/(S_i - S_{ib})] \times 100 \quad \text{Ekvation [13]}$$

där

$D_p^{\,1}$ = korrigerad primär nedbrytning av testämnet (%),

S_{ib} = testämnets ”uppenbara” koncentration i blankkontrollerna (mg/l),

S_{eb} = testämnets ”uppenbara” koncentrationen i blankkontrollerna i slutet av testet (mg/l).

Resultatens giltighet

50. Man bör endast använda tryckavläsningar från kärl som inte uppvisar rosa färgning (se punkt 33). Kontamineringen av syre minimeras genom användning av lämpliga anaeroba hanteringsmetoder.

51. Testet bör anses som giltigt om referensämnet har nått en platå som representerar en bionedbrytning på mer än 60 % ([300]).

52. Om pH-värdet i slutet av testet har överskridit 7 ± 1 och bionedbrytningen har varit otillräcklig måste testet upprepas med ökad buffertkapacitet i mediet.

Hämning av nedbrytningen

53. Gasproduktionen i kärl som innehåller både testämne och referensämne bör vara minst lika hög som i de kärl som endast innehåller referensämne. Om detta inte är fallet tyder det på att gasproduktionen är hämmad. I vissa fall kommer gasproduktionen i kärl som innehåller testämne utan referensämne att vara lägre än i blankkontrollerna, vilket tyder på att testämnet är hämmande.

Testrapport

54. Testrapporten ska innehålla följande uppgifter:

Testämne:

— trivialnamn, kemisk beteckning, CAS-nummer, strukturformel och relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper,

— testämnets renhet (orenheter i testämnet),

Testbetingelser:

— volymerna av den utspädda rötvätskan (V_l) och gasutrymmet (V_h) i kärlet,

— beskrivning av testkärlen, de huvudsakliga kännetecknen (t.ex. typ av tryckmätare) för biogasmätningarna och för analysatorn av oorganiskt kol,

— tillsatsen av testämnet och referensämnet till testsystemet: den använda testkoncentrationen och den eventuella användningen av lösningsmedel,

— uppgifter om det inokulat som används: namn på avloppsreningsverket, beskrivning av källan till det behandlade avloppsvattnet (t.ex. driftstemperatur, slamretentionstid, huvudsakligen hushållsavlopp, osv.), koncentration, all information som behövs för att bestyrka detta och information om eventuell förbehandling av inokulatet (t.ex. förberedande rötbehandling, förexponering),

— inkubationstemperatur,

— antal replikat.

([300]) Detta bör omprövas om adsorptiva och olösliga referenskemikalier ingår.

▼M6

Resultat:

— pH-värde och värdet för oorganiskt kol vid testets slut.

— testämnets koncentration i början och i slutet av testet om en särskild mätning har genomförts,

— alla uppmätta data som samlas in i kärlen för testämnet, blankprovet, referensämnet och hämningskontrollen, beroende på vad som är tillämpligt (t.ex. tryck i millibar, koncentrationen av oorganiskt kol (mg/l)), i tabellform (uppmätta data för gasutrymmet och vätskan ska rapporteras separat),

— statistisk behandling av data, testets varaktighet och ett diagram över den biologiska nedbrytningen av testämnet, referensämnet och hämningskontrollerna,

— procentandel biologisk nedbrytning av testämnet och referensämnet,

— motivering för eventuella förkastade testresultat,

— diskussion av resultaten.

LITTERATUR

(1) Följande kapitel i denna bilaga:

C.4, Bestämning av ”lätt” bionedbrytbarhet,

C.9, Bionedbrytning – Zahn-Wellens test,

C.10, Simulationstest – aerob avloppsvattenbehandling:

A: Enheterna för aktiverat slam, B: Biofilmer

C.11, Biologisk nedbrytbarhet – Aktiverat slam – respirationshämningstest

(2) OECD (2009) Inherent Biodegradability: Modified MITI Test (II), OECD Guideline for Testing of Chemicals, No. 302C, OECD, Paris

(3) Birch, R. R., Biver, C., Campagna, R., Gledhill, W. E., Pagga,U., Steber, J., Reust, H. och Bontinck, W. J. (1989) Screening of chemicals for anaerobic biodegradation. Chemosphere 19, 1527–1550. (också publicerad som ECETOC Technical Report No. 28, juni 1988).

(4) Shelton, D. R. och Tiedje, J. M. (1984) General method for determining anaerobic biodegradation potential. Appl. Environ. Microbiology, 47, 850–857.

(5) Owen, W. F., Stuckey, D. C., Healy Jr., J. B., Young L.,Y. och McCarty, P. L. (1979) Bioassay for monitoring biochemical methane potential and anaerobic toxicity. Water Res. 13, 485–492.

(6) Healy Jr., J. B. och Young, L. Y. (1979) Anaerobic biodegradation of eleven aromatic compounds to methane. Appl. Environ. Microbiol. 38, 84–89.

(7) Gledhill, W. E. (1979) Proposed standard practice for the determination of the anaerobic biodegradation of organic chemicals. Working document. Draft 2 no.35.24. American Society for Testing Materials, Philadelphia.

(8) Battersby, N. S. och Wilson, V. (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) Internationella standardiseringsorganisationen (1999) ISO 11734 Vattenundersökningar – Bestämning av den ”ultimata” anaeroba bionedbrytbarheten av organiska föreningar i rötslam – Metod genom mätning av mängden producerad biogas.

(12) Internationella standardiseringsorganisationen (2003) ISO 13641-1 Water Quality – Determination of inhibition of gas production of anaerobic bacteria – Part 1 General Test.

(13) Internationella standardiseringsorganisationen (1996) ISO 10634 Vattenundersökningar – Handledning för beredning och handhavande av i vatten svårlösliga organiska föreningar för efterföljande utvärdering av deras bionedbrytbarhet i vattenlösning.

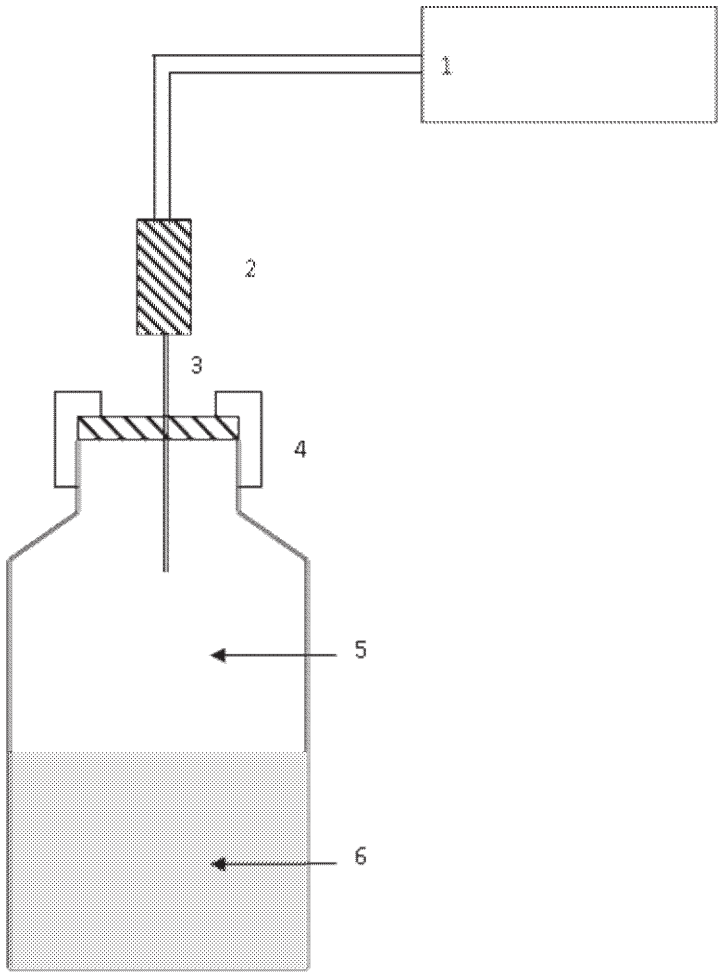
(14) Pagga, U. och Beimborn, D. B., (1993) Anaerobic biodegradation test for organic compounds. Chemosphere, 27, 1499–1509.

(15) Internationella standardiseringsorganisationen (1997) ISO 11923 Water Quality – Determination of suspended solids by filtration through glass-fibre filters.

▼**M6**

Tillägg 1

Exempel på utrustning för mätning av biogasproduktion via gastrycket



Teckenförklaring:

1 – Tryckmätare

2 – Gastät trevägsventil

3 – Kanyl

4 – Gastät förslutning (kraglock och septum)

5 – Gasutrymme (V_h)

6 – Rötslaminokulat (V_l)

Testkärl i en miljö med temperaturen 35 ± 2 °C

▼M6

Tillägg 2

Omvandling av tryckmätningarna

Avläsningarna från tryckmätaren kan relateras till gasvolymer med hjälp av en standardkurva som genereras genom injicering av kända volymer luft vid 35 ± 2 °C i injektionsflaskor som innehåller en volym vatten som motsvarar volymen av reaktionsblandningen, V_R:

— Fördela V_R ml alikvoter av vatten vars temperatur bibehålls vid 35 ± 2 °C i fem injektionsflaskor. Försegla flaskorna och placera dem i ett vattenbad vid 35 °C i en timme för att uppnå jämvikt.

— Slå på tryckmätaren, låt den stabiliseras, och justera till noll.

— För in kanylen genom förseglingen på en av flaskorna, öppna ventilen till dess att tryckmätaren visar noll och stäng därefter ventilen.

— Upprepa detta förfarande med de återstående flaskorna.

— Injicera 1 ml luft vid 35 ± 2 °C i varje flaska. För in nålen (på mätaren) genom förseglingen på en av flaskorna och låt tryckavläsningen stabiliseras. Registrera trycket, öppna ventilen till dess att trycket visar noll och stäng därefter ventilen.

— Upprepa förfarandet med de återstående flaskorna.

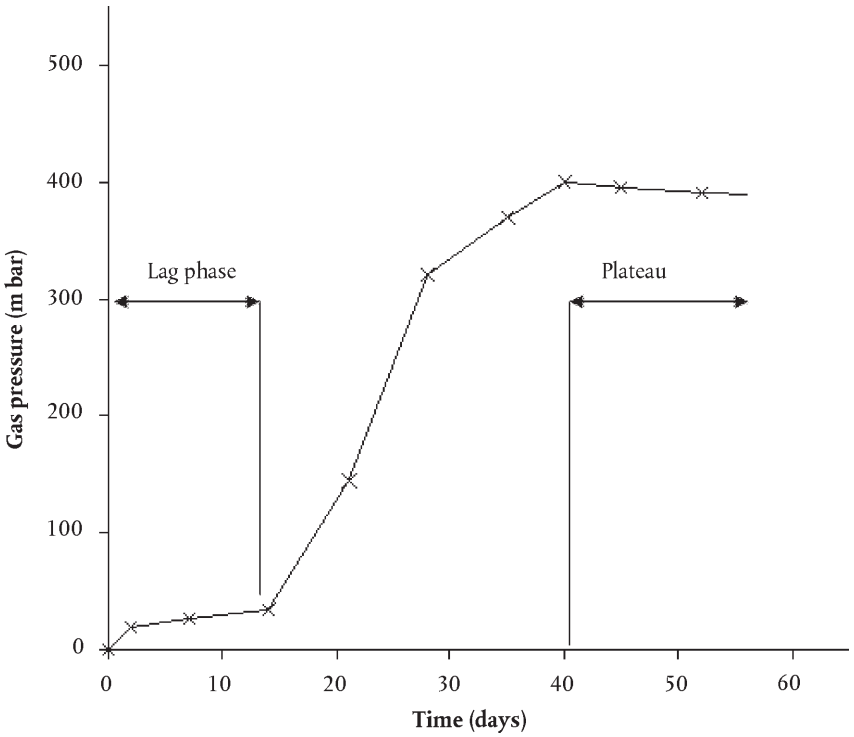
— Upprepa hela förfarandet ovan med 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 8 ml, 10 ml, 12 ml, 16 ml, 20 ml och 50 ml luft.

— Rita en omvandlingskurva över trycket (Pa) mot volymen gas som injicerats Vb (ml). Mätresultaten från instrumentet är linjära i intervallet mellan 0 Pa till 70 000 Pa, och 0 ml till 50 ml gasproduktion.

▼**M6**

Tillägg 3

Exempel på en nedbrytningskurva (kumulativ nettotryckökning)



▼M6

Tillägg 4

Exempel på resultatformulär för testet för anaerob nedbrytning – Resultatformulär för testämnet

Laboratorium: ..... Testämne: ..... Test nr: .....

Testtemperatur (°C): ..... Gasutrymmets volym (V_h): .....l) Vätskans volym (V_l): .....l)

Mängden kol i testämnet $C_{c,v}$: .....(mg/l) m_v ([1]): .....(mg)

Dag	p_1 (test-ämne) (mbar)	p_2 (test-ämne) (mbar)	p_3 (test-ämne) (mbar)	p (test-ämne) medel-värde (mbar)	p_4 (blank-prov) (mbar)	p_5 (blank-prov) (mbar)	p_6 (blank-prov) (mbar)	p (blank-prov) medel-värde (mbar)	p (netto) testämne – blankprov medelvärde (mbar)	Δp (netto) Kumulativt (mbar)	m_h kol, gasutrymmet ([2]) (mg)	D_h Biologisk nedbrytbarhet ([3]) (%)
	$C_{IC,\ 1}$ test-ämne (mg)	$C_{IC,\ 2}$ test-ämne (mg)	$C_{IC,\ 3}$ test-ämne (mg)	C_{IC} medel-värde, test-ämne (mg)	$C_{IC,\ 4}$ blankprov (mg)	$C_{IC,\ 5}$ blankprov (mg)	$C_{IC,\ 6}$ blankprov (mg)	C_{IC} medel-värde, blank-prov (mg)	$C_{IC,\ netto}$ testämne – blankprov medel-värde (mg)	m_l vätske-formigt kol ([4]) (mg)	m_t kol, totalt ([5]) (mg)	D_t Biologisk nedbrytbarhet ([6]) (%)
oorganiskt kol (vid testslut)												
pH (vid testslut)												

([1]) Kol i testkärlet, m_v (mg): $m_v = C_{C,v} \times V_l$([2])

Kol i gasutrymmet, m_h (mg) vid normal inkubationstemperatur (35 °C): $m_h = 0{,}468\Delta p \times V_h$

([3]) Bionedbrytningen beräknas utifrån gasen i gasutrymmet, D_h (%): $D_h = (m_h \times 100)/m_v$

([4]) Kol i flytande form, m_l (mg): $m_l = C$IC,net $\times V_l$

([5]) Den totala massan gasformigt kol, m_t (mg): $m_t + m_l$

([6]) Den totala biologiska nedbrytningen, D_t (%): $D_t = (m_t \times 100)/m_v$

02008R0440 — SV — 18.05.2017 — 007.001 — 1991

▼M6

Laboratorium: ..... Referensämne: ..... Test nr: .....

Testtemperatur (°C): ..... Gasutrymmets volym (V_h): .....l) Vätskans volym (V_l) (liter): .....

Kol i referensämne $C_{c,v}$ (mg/l): ..... m_v ([1]) (mg): .....

Dag	p_1 (ref.) (mbar)	p_2 (ref.) (mbar)	p_3 (ref.) (mbar)	p (ref.) medel-värde (mbar)	p_4 (hämn.) (mbar)	p_5 (hämn.) (mbar)	p_6 (hämn.) (mbar)	p (hämn.) medel-värde (mbar)	p (ref.) ref. – blank-prov (mbar)	Δp (ref.) kumulativt (mbar)	m_h kol, gasutrym-met ([2]) (mg)	D_h Biologisk ned-brytbarhet ([3]) (%)
	$C_{IC,\ 1}$ ref. (mg)	$C_{IC,\ 2}$ ref. (mg)	$C_{IC,\ 3}$ ref. (mg)	C_{IC} medel-värde, ref. (mg)	$C_{IC,\ 4}$ hämn. (mg)	$C_{IC,\ 5}$ hämn. (mg)	$C_{IC,\ 6}$ hämn. (mg)	C_{IC} medel-värde, hämn. (mg)	$C_{IC,\ netto}$ ref. – hämn. (mg)	m_l vätske-formigt kol ([4]) (mg)	m_t kol, totalt ([5]) (mg)	D_t Biologisk ned-brytbarhet ([6]) (%)
oorganiskt kol (vid test-slut)												
pH (vid test-slut)												

([1]) Kol i testkärlet, m_v (mg): $m_v = C_{C,v} \times V_l$
([2]) Kol i gasutrymmet, m_h (mg) vid normal inkubationstemperatur (35 °C): $m_h = 0{,}468\Delta p \times V_h$
([3]) Bionedbrytningen beräknas utifrån gasen i gasutrymmet, D_h (%): $D_h = (m_h \times 100)/m_v$
([4]) Kol i flytande form, m_l (mg): $m_l = C_{IC,net} \times V_l$
([5]) Den totala massan gasformigt kol, m_t (mg): $m_t + m_l$
([6]) Den totala biologiska nedbrytningen, D_t (%): $D_t = (m_t \times 100)/m_v$

02008R0440 — SV — 18.05.2017 — 007.001 — 1992

▼M6

C.44 URLAKNING I JORDKOLONNER

INLEDNING

1. Denna testmetod motsvarar OECD:s testriktlinje (TG) 312 (2004). Syntetiska kemikalier kan nå jorden direkt genom avsiktlig applicering (t.ex. jordbrukskemikalier) eller på indirekt väg (t.ex. via avloppsvatten → avloppsslam → jord eller luft → våt-/torrdeposition). För riskbedömning av dessa kemikalier är det viktigt att uppskatta deras potential för omvandling i jord och för rörlighet (urlakning) till djupare jordlager och så småningom till grundvattnet.

2. Det finns flera metoder för att mäta risken för urlakning av kemikalier i jord under kontrollerade laboratoriebetingelser, t.ex. jordanalys med tunnskiktskromatografi, jordanalys med tjockskiktkromatografi, jordanalys med kolonnkromatografi och mätningar av adsorption – desorption (1) (2). För icke-joniserade kemikalier möjliggör fördelningskoefficienten n-oktanol/vatten (P_{ow}) en tidig uppskattning av deras adsorptions- och urlakningspotential (3) (4) (5).

3. Den metod som beskrivs i denna testmetod bygger på jordkolonnkromatografi i störd jord (se tillägg 1 för en definition). Två typer av försök utförs för bedömning av (i) testkemikaliens urlakningspotential, och (ii) omvandlingsprodukternas urlakningspotential (studie med åldrade rester [aged residues]) i jord under kontrollerade laboratoriebetingelser ([313]). Testmetoden baserar sig på befintliga metoder (6) (7) (8) (9) (10) (11).

4. Vid en OECD-workshop om valet av jord och sediment i Belgirate, Italien, 1995 (12) kom man överens om hur många och vilka jordtyper som ska användas i denna testmetod. Workshopen i Belgirate resulterade också i rekommendationer rörande insamling, hantering och lagring av jordprover för urlakningsexperiment.

PRINCIP FÖR TESTMETODEN

5. Kolonner tillverkade av lämpligt inert material (t.ex. glas, rostfritt stål, aluminium, teflon, PVC, etc.) packas med jord och mättas, och bringas därefter i jämvikt med en ”artificiellt regn”-lösning (för definition, se tillägg 1) och dräneras. Därefter behandlas ytan i varje jordkolonn med testkemikalien och/eller med åldrade rester av testkemikalien. Artificiellt regn tillförs därefter till jordkolonnerna och lakvattnet samlas upp. Efter urlakningsprocessen avlägsnas jorden från kolonnerna och delas upp i ett lämpligt antal segment beroende på den information man önskar få ifrån undersökningen. Varje jordsegment och lakvattnet analyseras därefter med avseende på testkemikalien och, om tillämpligt, omvandlingsprodukter eller andra kemikalier av intresse.

TESTMETODENS TILLÄMPBARHET

6. Testmetoden kan tillämpas på alla testkemikalier (omärkta eller radioaktivt märkta, t.ex. ^{14}C) för vilka det finns en analysmetod som är tillräckligt noggrann och känslig. Testmetoden bör inte användas för kemikalier som är lättflyktiga från jord och vatten och därmed inte stannar kvar i jorden och/eller lakvattnet under de försöksbetingelser som gäller för denna testmetod.

INFORMATION OM TESTKEMIKALIEN

7. Omärkta eller radioaktivt märkta testkemikalier kan användas för att mäta urlakningsegenskaperna i jordkolonner. Radioaktivt märkt material behövs för undersökning av urlakning av omvandlingsprodukter (åldrade rester av

([313]) Kolonnurlakningsstudier med bekämpningsmedel kan ge information om en testkemikalies rörlighet och dess omvandlingsprodukter och kan komplettera sorptionsstudier på hela partier.

▼M6

testkemikalien) och för bestämningar av massbalansen. ^{14}C-märkning rekommenderas, men även andra isotoper, t.ex. ^{14}C, ^{15}N, ^{3}H och ^{32}P, kan användas. Om möjligt bör märkningen placeras i molekylens mest stabila del(ar). Testämnets renhet bör vara minst 95 %.

8. De flesta kemikalier bör appliceras som ett enda ämne. För verksamma ämnen i växtskyddsmedel kan dock blandade produkter användas för att studera urlakningen av det ursprungliga testämnet, men det är i synnerhet viktigt att testa dessa medel när blandningen kan påverka frisättningshastigheten (t.ex. granulat eller depåpreparat). När det gäller särskilda krav på testets utformning för blandningar kan det vara lämpligt att samråda med tillsynsmyndigheten före testet. För urlakningsstudier av åldrade rester bör man använda ett rent ursprungligt testämne.

9. Innan man utför laktester i jordkolonnerna ska följande uppgifter om testkemikalien finnas tillgängliga:

   (1) löslighet i vatten [testmetod A.6] (13),

   (2) löslighet i organiska lösningsmedel,

   (3) ångtryck [testmetod A.4] (13) och Henrys lags konstant,

   (4) fördelningskoefficienten n-oktanol/vatten [testmetoderna A.8 och A.24] (13),

   (5) adsorptionskoefficienten (K_d, K_f eller K_{OC}) [testmetoderna C.18 och C.19] (13),

   (6) hydrolys [testmetod C.7] (13),

   (7) dissociationskonstant (pK_a) [OECD:s TG 112] (25),

   (8) aerob och anaerob omvandling i jord [testmetod C.23] (13).

   Anmärkning: Den temperatur vid vilken mätningarna görs bör rapporteras i respektive testrapport.

10. Mängden testkemikalie som tillförs jorden i kolonnerna bör vara tillräcklig för att möjliggöra påvisning av minst 0,5 % av den tillförda dosen i ett och samma segment. För verksamma kemikalier i växtskyddsmedel kan mängden testkemikalie som appliceras motsvara den högsta rekommenderade bruksdosen (en enstaka applicering).

11. En lämplig analysmetod med känd noggrannhet, precision och känslighet för kvantifiering av testkemikalien och, i förekommande fall, dess omvandlingsprodukter i jord och lakvatten ska vara tillgänglig. Den analytiska detektionsgränsen för testkemikalien och dess viktigaste omvandlingsprodukter (normalt minst alla omvandlingsprodukter som utgör $\geq$ 10 % av den tillförda dosen och som observerats i studier av omvandlingsmönster, men helst alla relevanta omvandlingsprodukter av intresse) bör också vara kända (se punkt 17).

▼M6

REFERENSKEMIKALIER

12. Referenskemikalier med känt urlakningsbeteende, såsom atrazin eller monuron, som kan anses vara måttliga urlakningsämnen på fältet, bör användas för att utvärdera testkemikaliens relativa rörlighet i jord (1) (8) (11). En icke-sorberande och icke biologiskt nedbrytbar polär referenskemikalie (t.ex. tritium, bromid, fluorescein, eosin) som kan spåra vattnets rörelse i kolonnen kan också vara till nytta för att bekräfta jordkolonnens hydrodynamiska egenskaper.

13. Standardkemikalier för analys kan också vara till nytta för karakterisering och/eller identifiering av omvandlingsprodukter i jordsegmenten och i lakvattnet genom kromatografiska och spektroskopiska metoder eller andra relevanta metoder.

DEFINITIONER OCH ENHETER

14. Se tillägg 1.

KVALITETSKRITERIER

Utbyte

15. Summan av procentandelarna av testkemikalien som återfinns i jordsegmenten och kolonnens lakvatten efter urlakningen ger utbytet för urlakningsförsöket. Utbytet bör ligga på mellan 90 % och 110 % för radioaktivt märkta kemikalier (11) och mellan 70 % och 110 % för omärkta kemikalier (8).

Analysmetodens repeterbarhet och känslighet

16. Analysmetodens repeterbarhet när det gäller att kvantifiera testämnet och omvandlingsprodukterna kan kontrolleras genom en duplikatanalys av samma extrakt från ett jordsegment eller från lakvattnet (se punkt 11).

17. Analysmetodens detektionsgräns (LOD) för testkemikalien och för omvandlingsprodukterna bör vara minst 0,01 mg · kg^{-1} i varje jordsegment eller i lakvattnet (som testkemikalie) eller 0,5 % av den tillförda dosen i ett enskilt segment, beroende på vilket som är lägst. Kvantifieringsgränsen (LOQ) bör också anges.

BESKRIVNING AV TESTMETODEN

Testsystem

18. Urlakningskolonner (delbara eller icke-delbara) tillverkade av lämpligt inert material (t.ex. glas, rostfritt stål, aluminium, teflon, PVC, etc.) med en inre diameter på minst 4 cm och en höjd på minst 35 cm används för testet. Kolonnmaterialet bör testas för möjliga reaktioner med testkemikalien och/eller dess omvandlingsprodukter. Exempel på lämpliga delbara och icke-delbara kolonner visas i tillägg 2.

19. Sked, kolv och vibrationsapparat används för att fylla och packa jordkolonnerna.

20. För tillförsel av artificiellt regn till jordkolonnerna kan man använda kolvpumpar eller peristaltiska pumpar, duschhuvuden, Mariotteflaskor eller enkla dropptrattar.

▼M6

Laboratorieutrustning och kemikalier

21. Normal laboratorieutrustning krävs, i synnerhet följande:

(1) analysinstrument såsom utrustning för gas-vätskekromatografi (GLC), högtrycksvätskekromatografi (HPLC) och tunnskiktskromatografi (TLC), inbegripet lämpliga detektionssystem för analys av radioaktivt märkta eller omärkta ämnen eller för metoden med invers isotoputspädning,

(2) instrument för identifiering (t.ex. masspektrometer, gaskromatograf-masspektrometer, vätskekromatograf-masspektrometer, NMR-spektrometer, etc.),

(3) vätskescintillationsräknare för radioaktivt märkta testkemikalier,

(4) oxidationsmedel för förbränning av märkt material,

(5) extraktionsapparatur (till exempel centrifugrör för kallextraktion och Soxhlet-apparatur för kontinuerlig extraktion med återflöde),

(6) instrument för att koncentrera lösningar och extrakt (t.ex. rotationsevaporator).

22. Kemikalier som kan användas inbegriper organiska lösningsmedel av analyskvalitet, såsom aceton, metanol, etc., scintillatorvätska, 0,01 M $CaCl_2$-lösning i destillerat eller avjonat vatten (artificiellt regn).

Testkemikalie

23. Innan tillsättning av testkemikalien till jordkolonnerna bör den först lösas upp i vatten (avjonat eller destillerat). Om testkemikalien är svårlöslig i vatten kan den appliceras antingen som beredningar (efter att vid behov ha suspenderats eller emulgerats i vatten) eller i organiska lösningsmedel. Om ett organiskt lösningsmedel används bör det begränsas till ett minimum, och det bör få avdunsta från jordytan i kolonnen innan utlakningsförfarandet påbörjas. Fasta beredningar, såsom granulat, bör appliceras i fast form utan vatten. För att se till att den fördelas bättre över ytan i jordkolonnen kan beredningen blandas med en liten mängd kvartssand (t.ex. 1 g) före appliceringen.

24. Mängden testkemikalie som tillförs jorden i kolonnerna bör vara tillräcklig för att möjliggöra påvisning av minst 0,5 % av den tillförda dosen i ett och samma segment. För verksamma ämnen i växtskyddsmedel kan detta baseras på den rekommenderade maximala bruksdosen (enstaka applicering) och bör, för både ursprungligt och åldrat lakvatten, stå i förhållande till ytarean på den jordkolonn som används ([1]).

Referenskemikalie

25. En referenskemikalie bör användas i urlakningsexperimenten (se punkt 12). Den bör appliceras på jordytan i kolonnen på ett liknande sätt som testkemikalien och i lämplig grad som möjliggör nöjaktig påvisning antingen som

([1]) Den mängd som ska tillsättas i de cylindriska jordkolonnerna kan beräknas med följande formel:

$$M\ [\mu g] = \frac{A\ [kg/ha] \cdot 10^9 [\mu g/kg] \cdot d^2 [cm^2] \cdot \pi}{10^8 [cm^2/ha] \cdot 4}$$

där
M = tillsatt mängd per kolonn [µg]
A = appliceringsgrad [$kg \cdot ha^{-1}$]
D = jordkolonnens diameter [m^3]
π = 3,14

▼M6

intern standard tillsammans med testkemikalien i samma jordkolonn eller för sig i en separat jordkolonn. Man bör helst använda båda kemikalierna i samma kolonn, utom när båda kemikalierna är märkta på samma sätt.

Jord

Val av jord

26. För urlakningsstudier med den ursprungliga testkemikalien bör man använda 3–4 jordtyper med varierande pH, halt organiskt kol och textur (12). Anvisningar för val av jordar för urlakningsexperiment ges i tabell 1 nedan. För joniserbara testkemikalier bör de utvalda jordarna omfatta ett stort pH-område för att man ska kunna bedöma kemikaliens rörlighet i sin joniserade och ojoniserade form. Minst tre jordtyper bör ha ett pH-värde vid vilket testkemikalien förekommer i sin mobila form.

Tabell 1

Anvisningar för val av jordar för urlakningsstudier

Jord nr	pH-värde	Organiskt kol %	Lerhalt %	Textur (*)
1	> 7,5	3,5–5,0	20–40	clay loam
2	5,5–7,0	1,5–3,0	15–25	silt loam
3	4,0–5,5	3,0–4,0	15–30	loam
4	< 4,0–6,0 §	< 0,5–1,5 § ‡	< 10–15 §	loamy sand
5	< 4,5	> 10 #	< 10	loamy sand/sand

(*) Enligt FAO:s och USDA:s system (14).

§ Variablernas värden ska helst ligga inom de angivna intervallen. Om det är svårt att hitta lämpligt jordmaterial kan värden under det angivna minimivärdet godtas.

‡ Jordar med mindre än 0,3 % organiskt kol kan störa det inbördes förhållandet mellan halten av organiskt material och adsorptionen. Det är därför tillrådligt att använda jordar med en minimihalt på 0,3 % organiskt kol.

Jordar med mycket högt kolinnehåll (t.ex. > 10 %) kan eventuellt inte vara juridiskt godtagbara, t.ex. för registrering av bekämpningsmedel.

27. Det kan ibland vara nödvändigt att använda andra jordtyper för att representera svalare, tempererade och tropiska regioner. Om andra jordtyper väljs ska de karakteriseras med samma parametrar och ha liknande variationer i fråga om de egenskaper som beskrivs i vägledningen för val av jordar för urlakningsstudier (se tabell 1 ovan), även om de inte behöver motsvara kriterierna exakt.

28. För urlakningsstudier med ”åldrade rester” bör en enda jord användas (12). Den bör ha en sandhalt på > 70 % och en organisk kolhalt på 0,5–1,5 % (t.ex. jord nr 4 i tabell 1). Man kan behöva använda fler jordtyper om data rörande omvandlingsprodukter är viktiga.

29. All jord bör karakteriseras åtminstone med avseende på textur (% sand, % silt, % lera enligt FAO:s och USDA:s klassificeringssystem (14)), pH, katjonbyteskapacitet, halt organiskt kol, bulktäthet (för störda jordar) och vattenhållningskapacitet. Mätning av den mikrobiella biomassan krävs endast för jord som används i åldrandet/inkubationstiden som föregår experimentet

▼M6

med åldrad urlakning. Ytterligare information om jordens egenskaper (t.ex. jordmånsklassificering, lermineralogi, särskild ytarea) kan vara användbar för tolkningen av de erhållna resultaten i denna studie. För bestämning av jordens egenskaper kan de metoder som rekommenderas i hänvisningarna (15), (16), (17), (18) (19) användas.

Insamling och lagring av jordprover

30. Jorden bör tas från det översta lagret (horisont A) till ett maximidjup på 20 cm. Rester av vegetation, makrofauna och stenar avlägsnas. Jordarna (utom de som används för att åldra testkemikalien) lufttorkas vid rumstemperatur (helst 20–25 °C). Finfördelningen ska göras så varsamt som möjligt för att minimera förändringarna i jordens ursprungliga textur. Jordarna sållas genom en < 2 mm sikt. Omsorgsfull homogenisering rekommenderas eftersom resultatens reproducerbarhet då förbättras. Före användning kan jorden förvaras vid omgivande temperatur och ska hållas lufttorkad (12). Det finns ingen rekommenderad gräns för hur länge jorden bör lagras, men jordprover som lagrats i mer än tre år före användning bör analyseras på nytt med avseende på halten av organiskt kol och pH-värdet.

31. Detaljerad information om insamlingsplatsernas historia bör finnas tillgänglig. Upplysningarna bör omfatta det exakta läget (anges exakt med UTM-koordinater (Universal Transversal Mercator-Projection/European Horizontal Datum) eller geografiska koordinater), vegetationstäcke, behandlingar med växtskyddskemikalier, behandlingar med organiska och oorganiska gödselmedel, tillförsel av biologiska material eller oavsiktlig förorening (12). Om jorden har behandlats med testkemikalien eller ett strukturellt analogt ämne inom de fyra senaste åren bör den inte användas för undersökningar rörande urlakning.

Testbetingelser

32. Under testperioden bör urlakningskolonnerna med jord förvaras i mörker vid samma temperatur som omgivningen förutsatt att denna temperatur hålls inom ± 2 °C. Rekommenderad temperatur är mellan 18 och 25 °C.

33. Konstgjort regn (0,01 M $CaCl_2$) bör tillföras kontinuerligt på jordytan i kolonnerna med en mängd på 200 mm under en period på 48 timmar ([1]). Denna volym motsvarar en tillsats av 251 ml i en kolonn med en innerdiameter på 4 cm. Om det krävs för testsyftet kan andra volymer artificiellt regn och längre varaktighet dessutom användas.

Testförfarande

Urlakning med ursprunglig testkemikalie

34. Minst två urlakningskolonner packas med obehandlad, lufttorkad och siktad jord (< 2 mm) upp till en höjd av ca 30 cm. För att uppnå enhetlig packning bör jorden tillsättas kolonnerna i små portioner med en sked och pressas med en kolv under samtidig vibrering av kolonnerna till dess att jordkolonnens yta inte sjunker ytterligare. Det krävs att packningen är enhetlig för att man ska uppnå reproducerbara resultat från urlakningskolonnerna. För närmare

([1]) Detta simulerar en mycket hög nederbörd. Den genomsnittliga årliga nederbörden, t.ex. i Centraleuropa, är i storleksordningen 800–1 000 mm.

▼M6

information om kolonnpackningsmetoder, se hänvisningarna (20), (21) och (22). För att kontrollera packningsförfarandets reproducerbarhet fastställs den totala vikten av den jord som packats i kolonnerna ([1]). Duplikatkolonnerna bör ha liknande vikt.

35. Efter packningen förhandsfuktas kolonnerna med artificiellt regn (0,01 M $CaCl_2$) nedifrån och upp för att vattnet ska tränga bort luften i jordens porer. Därefter får jordkolonnerna stå och stabiliseras, och överflödigt vatten får rinna av med hjälp av gravitationen. Olika metoder för kolonnmättnad granskas i hänvisning (23).

36. Efter detta appliceras testkemikalien och referenskemikalien på jordkolonnerna (se även punkterna 23–25). För att erhålla en homogen fördelning av lösningarna, suspensionerna eller emulsionerna av test- och/eller referenskemikalien bör dessa anbringas jämnt fördelade över jordkolonnernas yta. Om det rekommenderas att testkemikalien appliceras genom nedblandning i jorden bör den blandas ner i små mängder (t.ex. 20 g) jord och läggas till på jordkolonnens yta.

37. Jordkolonnernas ytor täcks sedan med en sintringsplatta av glas, glaspärlor, glasfiberfilter eller ett runt filterpapper för att det artificiella regnet ska fördelas jämnt över hela ytan och för att undvika att regndropparna stör jordytan. Ju större kolonndiametern är desto försiktigare måste man vara när man tillför det artificiella regnet i jordkolonnerna för att säkerställa en jämn fördelning av det artificiella regnet över markytan. Därefter tillförs det artificiella regnet droppvis till jordkolonnerna med hjälp av en kolv eller en peristaltisk pump eller en dropptratt. Helst bör lakvattnet samlas in i delar och deras respektive volymer registreras ([2]).

38. Efter urlakning och dränering av kolonnerna delas de upp i ett lämpligt antal segment beroende på den information man önskar få ifrån undersökningen. Segmenten extraheras därefter med lämpliga lösningsmedel eller lösningsmedelsblandningar och analyseras med avseende på testkemikalien och, om tillämpligt, med avseende på omvandlingsprodukter, total radioaktivitet och referenskemikalien. Lakvattnet eller lakvattensfraktionerna analyseras direkt eller efter extraktionen med avseende på samma produkter. När radioaktivt märkta testkemikalier används bör alla fraktioner som innehåller ≥ 10 % av den tillförda radioaktiviteten identifieras.

Urlakning med åldrade rester

39. Färsk jord (inte jord som tidigare lufttorkats) behandlas med en volym av den radioaktivt märkta testkemikalien som motsvarar ytarealen i jordkolonnerna (se punkt 24) och inkuberas under aeroba förhållanden i enlighet med testmetod C.23 (13). Inkubationstiden (åldringsperioden) bör vara så lång att

([1]) Exempel på packningstäthet för störd jord är som följer:för sandjord 1,66 g · ml^{-1}
för lerig sandjord 1,58 g · ml^{-1}
för lerjord 1,17 g · ml^{-1}
för siltjord 1,11 · g ml^{-1}

([2]) Typiska lakvattensvolymer varierar från 230–260 ml, vilket motsvarar ungefär 92–104 % av den totala tillförda mängden artificiellt regn (251 ml) vid användning av jordkolonner med 4 cm diameter och 30 cm längd.

▼M6

betydande mängder omvandlingsprodukter hinner bildas. En åldringsperiod på testkemikaliens halveringstid rekommenderas ([1]), men den bör inte överstiga 120 dagar. Före urlakningen analyseras den åldrade jorden med avseende på testkemikalien och dess omvandlingsprodukter.

40. Urlakningskolonnerna packas upp till en höjd av 28 cm med samma jord (fast lufttorkad) som används i åldringsförsöket enligt beskrivning i punkt 34, och vikten av de packade jordkolonnerna totalt bestäms också. Jordkolonnerna förhandsfuktas sedan enligt beskrivningen i punkt 35.

41. Därefter appliceras testämnet och dess omvandlingsprodukter på jordytan i kolonnerna i form av åldrade rester i jord (se punkt 39) i ett 2 cm jordskikt. Jordkolonnernas totala höjd (obehandlad jord + åldrad jord) bör helst inte överskrida 30 cm (se punkt 34).

42. Urlakningen utförs enligt beskrivning i punkt 37.

43. Efter urlakningen analyseras jordsegmenten och lakvattnet på det sätt som anges i tabellen i punkt 38 med avseende på testkemikalien, dess omvandlingsprodukter och icke-extraherbara radioaktivitet. För att fastställa hur mycket av åldrade rester som finns kvar i det översta 2 cm tjocka lagret efter urlakningen bör detta skikt analyseras separat.

DATA OCH RAPPORTERING

Behandling av resultaten

44. Mängden testkemikalie, omvandlingsprodukter, icke-extraherbar radioaktivitet och, i förekommande fall, referenskemikalie bör anges som en procentandel av initialdosen för varje jordsegment och lakvattensfraktion. En grafisk presentation bör tillhandahållas för varje kolonn i vilken procentandelarna som erhållits plottas som en funktion av jordskiktens djup.

45. När en referenskemikalie ingår i dessa kolonnurlakningsstudier kan urlakningen av en kemikalie utvärderas på en relativ skala med hjälp av relativa rörlighetsfaktorer (RMF, för definition se tillägg 3) (1) (11) som möjliggör en jämförelse av urlakningsdata för olika kemikalier som erhållits med olika jordtyper. Exempel på RMF-värden för olika växtskyddskemikalier anges i tillägg 3.

46. Uppskattningar av K_{oc} (den normaliserade adsorptionskoefficienten för organiskt kol) och K_{om} (den normaliserade fördelningskoefficienten för organiskt material) kan också erhållas utifrån kolonnurlakningsresultat med hjälp av genomsnittligt urlakningsavstånd eller fastställda samband mellan RMF och K_{oc} respektive K_{om} (4), eller genom tillämpning av enkel kromatografisk teori (24). Den senare metoden bör dock användas med försiktighet, framför allt med tanke på att urlakningsprocessen inte endast gäller mättade flödesförhållanden, utan snarare omättade system.

([1]) Mer än en viktig omvandlingsprodukt som kan bildas i jord kan också uppstå vid olika tidpunkter under en omvandlingsstudie. I sådana fall kan det vara nödvändigt att utföra urlakningsstudier med åldrade rester av olika ålder.

▼M6

Tolkning av resultaten

47. Kolonnurlakningsstudierna som beskrivs i denna metod det möjligt att fastställa testkemikaliens urlaknings- eller rörlighetspotential i jord (i den ursprungliga urlakningsstudien) och/eller dess omvandlingsprodukter (i studien om urlakning av åldrade rester). Dessa tester tillhandahåller inte en kvantitativ prognos för urlakningsprocesser under fältförhållanden, men de kan användas för att jämföra ”lakbarheten” av en kemikalie med andra kemikalier vars urlakningsbeteende kan vara känt (24). På samma sätt mäter de inte kvantitativt procentandelen av den tillförda mängden kemikalie som kan nå grundvattnet (11). Resultaten av kolonnurlakningsstudier kan dock vara till hjälp för att avgöra om ytterligare studier under fältliknande förhållanden och fälttester måste utföras för kemikalier som uppvisar en hög rörlighetspotential i laboratorietester.

Testrapport

48. Rapporten ska innehålla följande:

Testkemikalie och referenskemikalie (i förekommande fall):

— trivialnamn, kemisk beteckning (IUPAC- och CAS-namn), CAS-nummer, kemisk struktur (med angivelse av märkningsposition om radioaktivt märkt material används) och relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper,

— testkemikaliens renhet (orenheter i testkemikalien),

— strålningskemisk renhet hos märkta kemikalier och specifik aktivitet (i tillämpliga fall).

Testjord:

— uppgifter om provtagningsstället,

— jordens egenskaper, såsom pH, halten organiskt kol och lera, textur och skrymdensitet (för störd jord),

— jordens mikrobiella aktivitet (endast för jord som används för åldring av testkemikalien),

— hur länge jorden har lagrats och lagringsbetingelserna.

Testbetingelser:

— datum för utförandet av studierna,

— urlakningskolonnernas längd och diameter,

— jordens totala vikt i jordkolonnerna,

— mängden testkemikalie och, i förekommande fall, referenskemikalie som applicerats,

— mängd, frekvens och varaktighet för tillförsel av artificiellt regn,

— försökstemperatur,

— antal replikat (minst två),

— metoder för analys av testkemikalien, omvandlingsprodukterna och, i förekommande fall, referenskemikalien i de olika jordsegmenten och lakvattnen,

— metoder för karakterisering och identifiering av omvandlingsprodukter i jordsegmenten och i lakvattnet.

▼**M6**

Testresultat:

— tabeller med resultaten uttryckta som koncentrationer och procentandelar av den tillförda dosen för jordsegment och lakvatten,

— massbalans, om så är lämpligt,

— lakvattensvolymer,

— urlakningsavstånd och, i förekommande fall, relativa rörlighetsfaktorer,

— grafisk avbildning av de erhållna procentandelarna i jordsegmenten mot respektive jordsegments djup,

— diskussion och tolkning av resultaten.

LITTERATUR

(1) Guth, J. A., Burkhard, N. och Eberle, D. O. (1976). Experimental Models for Studying the Persistence of Pesticides in Soil. Proc. BCPC Symposium: Persistence of Insecticides and Herbicides.

(2) Russel, M. H. (1995). Recommended approaches to assess pesticide mobility in soil. I Progress in Pesticide Biochemistry and Toxicology, Vol. 9: Environmental Behaviour of Agrochemicals – T. R. Roberts och P. C. Kearney, red.). J. Wiley & Sons.

(3) Briggs, G. G. (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) Chiou, C. T., Porter, P. E. och Schmedding, D. W. (1983). Partition equilibria of non-ionic organic compounds between soil organic matter and water. Environ. Sci. Technol. 17, 227–231.

(5) Guth, J. A. (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) Bilaga I till kommissionens direktiv 95/36/EG av den 14 juli 1995 om ändring av rådets direktiv 91/414/EEG om utsläppande av växtskyddsprodukter på marknaden, EGT L 172, 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 januari 1995.

(13) Följande kapitel i denna bilaga:

Kapitel A.4, Ångtryck

Kapitel A.6, Vattenlöslighet

▼M6

Kapitel A.8, Fördelningskoefficient, skakkolvmetoden

Kapitel A.24, Fördelningskoefficient, HPLC-metoden

Kapitel C.7, Nedbrytning – abiotisk nedbrytning: hydrolys som funktion av pH.

Kapitel C.18, Bestämning av adsorption och desorption i jord vid jämvikt i uppslammat jordprov

Kapitel C.23, Aerob och anaerob omvandling 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, red.). Agronomy Series No. 9, andra upplagan.

(16) Methods of Soil Analysis (1982). Part 2, Chemical and Microbiological Properties (A. L. Page, R. H. Miller och D. R. Kelney, red.). Agronomy Series No. 9, andra upplagan.

(17) ISO Standard Compendium Environment (1994). Soil Quality – General aspects; chemical and physical methods of analysis; biological methods of analysis. Första upplagan.

(18) Mückenhausen, E. (1975). Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen. DLG-Verlag, Frankfurt/Main.

(19) Scheffer, F. och Schachtschabel, P. (1998). Lehrbuch der Bodenkunde. F. Enke Verlag, Stuttgart.

(20) Weber, J. B. och Peeper, T. F. (1977). I Research Methods in Weed Science, andra upplagan (B. Truelove, red.). Soc. Weed Sci., Auburn, Alabama, 73–78.

(21) Weber, J. B., Swain, L. R., Strek, H. J. och Sartori, J. L. (1986). I Research Methods in Weed Science, tredje upplagan (N.D. Camper, red.). Soc. Weed Sci., Champaign, IL, 190–200.

(22) Oliveira, m.fl. (1996). Packing of sands for the production of homogeneous porous media. Soil Sci. Soc. Amer. J. 60(1): 49–53.

(23) Shackelford, C. D. (1991). Laboratory diffusion testing for waste disposal. – A review. J. Contam. Hydrol. 7, 177–217.

(24) (Hamaker, J. W. (1975). Interpretation of soil leaching experiments. I Environmental Dynamics of Pesticides (R. Haque, V. H. Freed, red.), 115–133. Plenum Press, New York.

(25) OECD (1981). Dissociation constants in water. OECD Guideline for Testing of Chemicals, No. 4112, OECD, Paris

▼M6

Tillägg 1

Definitioner och enheter

Åldrade rester i jord: Testkemikalie och omvandlingsprodukter som finns i jorden efter applicering och efter en period som är tillräckligt lång för att göra det möjligt för transport-, adsorptions- och dissipationsprocesser samt metaboliska processer att ändra fördelningen av och de kemiska egenskaperna hos en del av den applicerade kemikalien (1).

Artificiellt regn: 0,01 M $CaCl_2$-lösning i destillerat eller avjonat vatten.

Genomsnittligt urlakningsavstånd: Undre delen av jordsektionen där det kumulativa kemikalieutbytet = 50 % av utbytet för testkemikalien totalt [normalt urlakningsexperiment], eller (undre delen av jordsektionen där det kumulativa kemikalieutbytet = 50 % av utbytet för testkemikalien totalt) – ((tjockleken på skiktet med åldrade rester)/2) [studie av urlakning av åldrade rester]

Kemikalie: ett ämne eller en blandning.

Lakvatten: Vätskefas som filtrerats genom en jordprofil eller en jordkolonn (1).

Urlakning: Process genom vilken en kemikalie flyttas nedåt genom markprofilen eller en kolonn (1).

Urlakningsavstånd: Det djupaste jordsegment i vilket ≥ 0,5 % av den applicerade testkemikalien eller åldrade rester konstaterades efter utlakningsprocessen (motsvarande penetrationsdjup).

Detektionsgräns (LOD) och **kvantifieringsgräns (LOQ)**: Detektionsgränsen (LOD) är den koncentration av en kemikalie under vilken kemikalien inte kan särskiljas från analytiska artefakter. Kvantifieringsgränsen (LOQ) är den koncentration av en kemikalie under vilken koncentrationen inte kan bestämmas med tillräcklig noggrannhet.

RMF relativ rörlighetsfaktor: (urlakningsavstånd för testkemikalien (cm))/(urlakningsavstånd för referenskemikalien (cm)

Testkemikalie: alla ämnen eller blandningar som testas med denna testmetod

Omvandlingsprodukt: Alla kemikalier som uppstår till följd av testkemikaliens biotiska eller abiotiska omvandlingsreaktioner, inbegripet CO_2 och produkter som är bundna i rester.

Jord: En blandning av mineraliska och organiska kemiska beståndsdelar i vilken små (huvudsakligen mikroskopiska) organismer lever. De kemiska beståndsdelarna består av föreningar med hög kol- och kvävehalt samt hög molekylvikt. Jord kan hanteras i två olika tillstånd:

— ostörd, såsom den har utvecklats under tidens gång, i karakteristiska skikt med ett flertal olika jordtyper,

— störd, vilket normalt gäller för odlad mark eller när jordprover tas genom grävning och därefter undersöks med denna testmetod (2).

(1) Holland, P. T. (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 (antagen 12 maj 1981).

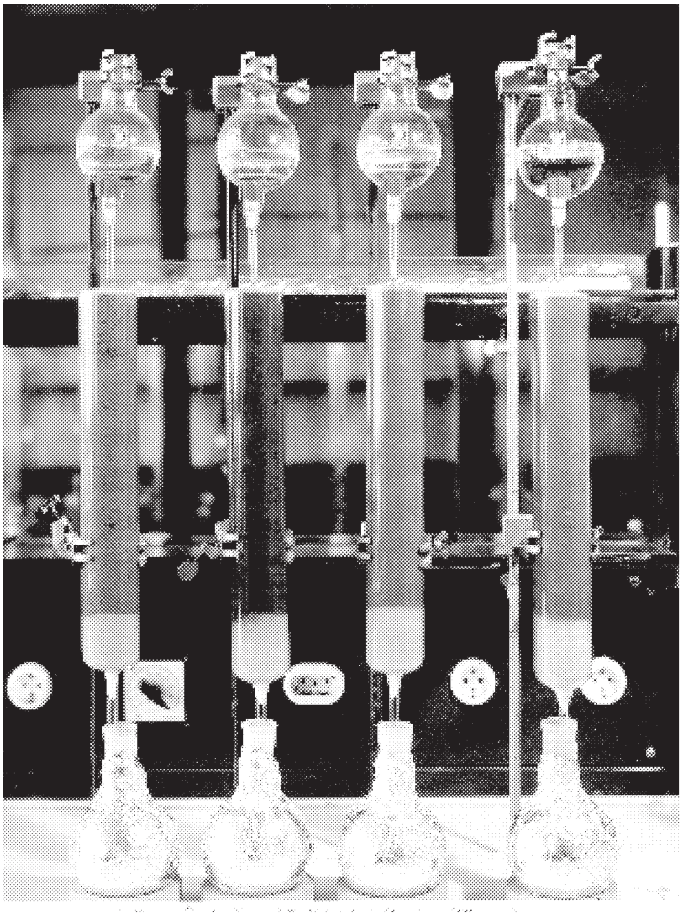
▼M6

Tillägg 2

Figur 1

Exempel på icke-delbara urlakningskolonner av glas

med en längd på 35 cm och en innerdiameter på 5 cm (1)



← Dropptrattar för tillförsel av artificiellt regn

← Sintringsplatta av glas för att undvika att jorden störs och för att jämnt fördela det artificiella regnet

← Glaskolonnen fylls med testjord (när man testar fotolabila produkter bör kolonnen viras in i aluminiumfolie)

← Skikt av kvartssand

← Glasullspropp för att hålla jorden kvar i kolonnen

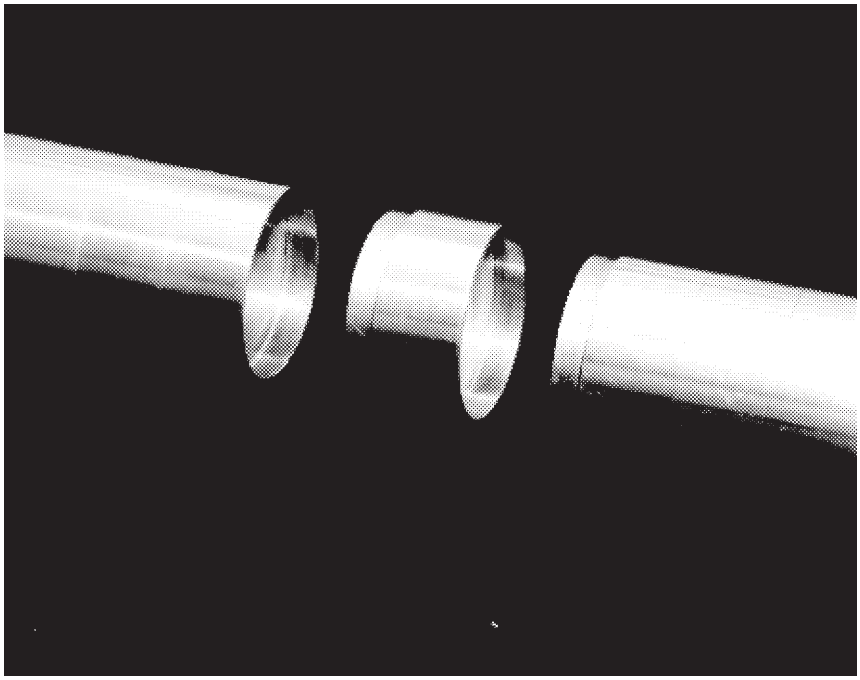
← Rundbottnad kolv för insamling av lakvatten, invirad i aluminiumfolie för att förhindra fotolys

(1) Drescher, N. (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

Exempel på en delbar metallkolonn med 4 cm innerdiameter (1)



(1) Burkhard, N., Eberle D. O. och Guth, J. A. (1975). Model systems for studying the environmental behaviour of pesticides. Environmental Quality and Safety, Suppl. Vol. III, 203–213.

▼M6

Tillägg 3

Exempel på relativa rörlighetsfaktorer (*) (RMF) för olika växtskyddskemikalier (1) (2) och motsvarande rörlighetsklasser (+)

RMF-intervall	Kemikalie (RMF)	Rörlighetsklass
≤ 0,15	Paration (< 0,15), fluorodifen (0,15)	I orörlig
0,15–0,8	Profenofos (0,18), propikonazol (0,23), diazinon (0,28), diuron (0,38), terbutylazin (0,52), metidation (0,56), prometryn (0,59), propazin (0,64), alaklor (0,66), metolaklor (0,68)	II något rörlig
0,8–1,3	Monuron (**) (1,00), atrazin (1,03), simazin (1,04), fluometuron (1,18)	III måttligt rörlig
1,3–2,5	Prometon (1,67), cyanazin (1,85), bromacil (1,91), karbutilat (1,98)	IV ganska rörlig
2,5–5,0	Karbofuran (3,00), dioxakarb (4,33)	V rörlig
> 5,0	Monokrotofos (> 5,0), dikrotofos (> 5,0)	VI mycket rörlig

(*) Den relativa rörlighetsfaktorn beräknas på följande sätt (3):

$$\text{RMF} = \frac{\text{urlakningsavstånd för testkemikalien(cm)}}{\text{urlakningsavstånd för referenskemikalien(cm)}}$$

(**) Referenskemikalie

\+ Andra system för klassificering av en kemikalies rörlighet i jord är baserade på R_f-värden från jordanalyser med tunnskiktskromatografi (4) och på K_{oc}-värden (5) (6).

(1) Guth, J. A. (1985). Adsorption/desorption. I Joint International Symposium ”Physicochemical Properties and their Role in Environmental Hazard Assessment.” Canterbury, Storbritannien, 1–3 juli 1985.

(2) Guth, J. A. och Hörmann, W. D. (1987). Problematik und Relevanz von Pflanzenschutzmittel-Spuren im Grund (Trink-) Wasser. Schr.Reihe Verein WaBoLu, 68, 91–106.

(3) Harris, C. I. (1967). Movement of herbicides in soil. Weeds 15, 214–216.

(4) Helling, C. S. (1971). Pesticide mobility in soils. Soil Sci. Soc. Am. Proc. 35, 743–748.

(5) McCall, P. J., Laskowski, D. A., Swann, R. L. och Dishburger, H. J. (1981). Measurements of sorption coefficients of organic chemicals and their use in environmental fate analysis. I Test Protocols for Environmental Fate and Movement of Toxicants. Proceedings of AOAC Symposium, AOAC, Washington D.C.

(6) Hollis, J. M. (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 UPPSKATTNING AV UTSLÄPP FRÅN TRÄSKYDDSBEHANDLAT VIRKE TILL MILJÖN: LABORATORIEMETOD FÖR TRÄBASERADE RÅVAROR SOM INTE ÄR TÄCKTA OCH SOM ÄR I KONTAKT MED SÖTVATTEN ELLER HAVSVATTEN

INLEDNING

1. Denna testmetod motsvarar OECD:s testriktlinje (TG) 313 (2007). Utsläppen från träskyddsbehandlat virke till miljön måste kvantifieras för att möjliggöra en miljöriskbedömning av behandlat trä. Genom denna testmetod beskrivs en laboratoriemetod för uppskattning av utsläpp från träskyddsbehandlat virke i två situationer där utsläpp kan komma ut i miljön:

   — Utsläpp från behandlat trä som är i kontakt med sötvatten. Utsläpp från ytan av det behandlade träet kan komma ut i vattnet.

   — Utsläpp från behandlat trä som är i kontakt med havsvatten. Utsläpp från ytan av det behandlade träet kan komma ut i havsvattnet.

2. Denna testmetod är avsedd för testning av utsläpp från trä och trävaror som inte är täckta och som är i kontakt med sötvatten eller havsvatten. Användningsklasserna används internationellt och kategoriserar den biologiska fara som den behandlade varan kommer att utsättas för. Användningsklasserna definierar även den situation i vilken den behandlade varan används och fastställer de delar av miljön (luft, vatten, jord) som potentiellt är utsatta för den risk som det träskyddsbehandlade virket utgör.

3. Testmetoden är ett laboratorieförfarande genom vilket man erhåller prov (emissat) från vatten som används för att indränka behandlat trä, under allt längre tidsintervall efter exponeringen. Mängden utsläpp i emissatet relateras till träets ytarea och exponeringens varaktighet, vilket gör att man erhåller ett flödesvärde i $mg/m^2/dag$. Flödet (urlakningen) efter förlängda exponeringstider kan därmed uppskattas.

4. Mängden utsläpp kan användas i en miljöriskbedömning av behandlat virke.

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN

5. Mekanismen för urlakning från träets yta i sötvatten antas inte vara identisk till sin natur och grad med urlakning från en träyta i havsvatten. För träskyddsmedel eller blandningar som används för behandling av trä som används i havsvattenmiljöer är det därför nödvändigt att genomföra en urlakningsstudie för havsvatten.

6. Träet, när det gäller trä som behandlats med träskyddsmedel, bör vara representativt för trä som används kommersiellt. Det bör behandlas i enlighet med träskyddsmedeltillverkarens instruktioner och i enlighet med lämpliga standarder och specifikationer. Parametrarna för efterbehandlingskonditioneringen av träet innan testets början bör anges.

7. De virkesprover som används bör vara representativa för de råvaror som används (t.ex. med avseende på art, täthet och andra egenskaper).

▼M6

8. Testet kan tillämpas på trä med hjälp av en invasiv process eller ytlig applicering eller på behandlat trä som har en ytterligare obligatorisk ytbehandling (t.ex. färg som appliceras som krav för kommersiellt bruk).

9. Vattnets sammansättning, mängd, pH och fysikaliska form är viktiga för fastställandet av kvantiteten, innehållet och karaktären av utsläppen från träprodukter.

PRINCIP FÖR TESTMETODEN

10. Provexemplar av behandlat trä doppas i vatten. Vattnet (emissatet) samlas in och analyseras kemiskt flera gånger under exponeringsperioden i tillräcklig utsträckning för att man ska kunna utföra statistiska beräkningar. Utsläpp i mg/m^2/dag beräknas utifrån analysresultaten. Provtagningsperioderna bör registreras. Tester med obehandlade prover kan avbrytas om inget bakgrundsvärde konstateras i de tre första datapunkterna.

11. Att testet omfattar provexemplar av obehandlat trä gör det möjligt att fastställa bakgrundsnivåerna för emissat från virket annat än de träskyddsmedel som används.

KVALITETSKRITERIER

Noggrannhet

12. Testmetodens noggrannhet när det gäller att uppskatta utsläpp beror på om provexemplaren är representativa för kommersiellt behandlat trä, hur representativt vattnet är för naturligt vatten och hur representativa exponeringsförhållandena är för naturliga förhållanden.

13. Analysmetodens noggrannhet, precision och repeterbarhet bör fastställas före testet.

Reproducerbarhet

14. Tre vattenprover samlas in och analyseras, och medelvärdet fastställs som utsläppsvärdet. Reproducerbarheten för resultaten inom ett och samma laboratorium och mellan olika laboratorier och beror på doppningsprocessen och det trä som används som provexemplar.

Godtagbar variationsvidd för resultaten

15. Variationsvidden för resultaten från detta test är godtagbar om det högsta och lägsta värdet inte varierar med mer än en storleksordning.

TESTBETINGELSER

Vatten

16. Urlakningsscenarier för sötvatten: avjonat vatten (t.ex. ASTM D 1193 typ II) rekommenderas för användning i laktester när trä som utsätts för sötvatten ska bedömas. Vattentemperaturen ska vara 20 ± 2 °C och pH-värdet och vattentemperaturen ska inkluderas i testrapporten. En analys av vattenprover tagna innan doppbehandlingen av provexemplaren gör det möjligt att uppskatta de analyserade kemikalierna i vattnet. Denna kontroll fastställer bakgrundsnivåerna för kemikalier som sedan analyseras kemiskt.

▼M6

17. Urlakningsscenarier för havsvatten: syntetiskt havsvatten (t.ex. ASTM D 1141 Substitute Ocean Water, without Heavy Metals) rekommenderas för användning i laktester när trä som utsätts för havsvatten ska bedömas. Vattentemperaturen ska vara 20 ± 2 °C och pH-värdet och vattentemperaturen ska inkluderas i testrapporten. En analys av vattenprover tagna innan doppbehandlingen av provexemplaren gör det möjligt att uppskatta de analyserade kemikalierna i vattnet. Denna kontroll fastställer bakgrundsnivåerna för de kemikalier som är av betydelse.

Virkesprover

18. Träslagen bör vara typiska för de träslag som används för effektivitetstester av träskyddsmedel. Rekommenderade arter är *Pinus sylvestris* L. (tall), *Pinus resinosa* Ait. (rödtall) eller *Pinus* spp. (Southern Pine [långbarrig tall, loblollytall m.fl.]). Ytterligare tester kan göras med andra arter.

19. Man bör använda virke med rak ådring och utan kvistar. Trä med hartsliknande utseende bör undvikas. Träet ska vara typiskt för kommersiellt tillgängligt virke. Källan, tätheten och antalet årsringar per 10 mm bör registreras.

20. Det rekommenderas att virkesproverna utgörs av uppsättningar om fem klossar med storlek i enlighet med EN 113 (25 mm × 50 mm × 15 mm) och med de längsgående sidorna parallella med ådringen, men andra dimensioner, t.ex. 50 mm x 150 mm x 10 mm, kan också användas. Provexemplaren ska nedsänkas helt i vattnet. Provexemplaren ska bestå av 100 % splintved. Varje prov ska vara märkt individuellt så att det kan identifieras genom hela testet.

21. Alla provexemplar ska vara hyvlade eller sågade jämna, och ytorna bör inte vara slipade.

22. Antalet uppsättningar virkesprover som används för analysen är minst fem: tre provuppsättningar behandlas med träskyddsmedel, en provuppsättning är obehandlad och en provuppsättning används för uppskattningen av fukthalten i ugnstorkade provexemplar före behandlingen. Ett tillräckligt antal provexemplar förbereds för att man ska kunna välja ut tre uppsättningar som ligger inom 5 % av medelvärdet för upptagningen av träskyddsmedel för hela samlingen av provexemplar.

23. Ändträet på alla provexemplar förseglas med en kemikalie som hindrar inträngning av träskyddsmedel i ändträet eller förhindrar urlakning från provexemplaren via ändträet. När det gäller förseglingen av ändträet är det nödvändigt att skilja mellan exemplar som används för ytapplicering och exemplar som används för impregneringsprocesser. Förseglingen av ändträet ska göras före behandlingen endast när det gäller ytapplicering.

24. Ändträet måste vara öppet för behandlingar med impregneringsprocesser. Därför ska provexemplarens ändträ förseglas i slutet av konditioneringsperioden. Utsläppen ska endast uppskattas för den längsgående ytan. Förseglingarna ska kontrolleras och vid behov förnyas innan urlakningen påbörjas, och bör inte förnyas efter urlakningen har påbörjats.

▼M6

Doppbehållare

25. Behållaren består av ett inert material och är tillräckligt stor för att rymma fem provexemplar av storleken EN 113 i 500 ml vatten, vilket ger ett förhållande mellan ytarean och vattenvolymen på 0,4 cm^2/ml.

Ställning för provexemplaren

26. Provexemplaren ska ligga på en ställning som gör att alla exponerade ytor på provexemplaret är i kontakt med vattnet.

FÖRFARANDE FÖR BEHANDLING MED TRÄSKYDDSMEDEL

Förberedelse av de behandlade provexemplaren

27. Virkesprovet som ska behandlas med träskyddsmedel under testet behandlas med den metod som anges för träskyddsmedlet, vilket kan vara en impregneringsbehandling eller en ytbehandling som kan antingen utgöras av doppning, sprejning eller pensling.

Träskyddsmedel som appliceras genom impregnering

28. Bered en lösning av träskyddsmedlet som kan uppnå den angivna upptagningen när den appliceras genom en impregneringsbehandling. Virkesprovet vägs och dess dimensioner mäts. Impregneringsbehandlingen bör vara såsom specificeras för applicering av träskyddsmedlet på virke för användning i användningsklass 4 eller 5. Provexemplaret vägs igen efter behandlingen och upptagningen av träskyddsmedlet (kg/m^3) beräknas enligt följande ekvation:

$$\frac{\textit{vikt efter behandling}(\mathrm{kg}) - \textit{vikt före behandling}(\mathrm{kg})}{\textit{provexemplarets volym}(\mathrm{m}^3)} \times \frac{\textit{lösningens koncentration}(\%\textit{vikt}/\textit{vikt})}{100}$$

29. Observera att virke som behandlats i industriella impregneringsverk (t.ex. genom vakuumtryckimpregnering) kan användas i detta test. De förfaranden som används bör registreras och upptagningen i materialet som har behandlats på detta sätt ska analyseras och registreras.

Träskyddsmedel som appliceras genom ytbehandling

30. Ytappliceringsprocessen omfattar doppning, sprejning eller pensling av virkesproverna. Processen och appliceringsgraden (t.ex. liter/m^2) bör vara såsom specificeras för ytapplicering av skyddsmedlet.

31. Notera i detta fall också att man kan använda trä som har behandlats i industriella impregneringsverk i detta test. De förfaranden som används bör registreras och upptagningen i materialet som har behandlats på detta sätt ska analyseras och registreras.

Konditionering av provexemplaren efter behandlingen

32. Efter behandling bör de behandlade provexemplaren konditioneras i enlighet med rekommendationerna från leverantören av testskyddsmedlet enligt skyddsmedlets märkeskrav eller enligt kommersiell behandlingspraxis eller i enlighet med standard EN 252.

▼M6

Beredning och urval av provexemplar

33. Efter avslutad konditionering beräknas medelvärdet för provexemplargruppens upptagning, och tre representativa uppsättningar provexemplar med en upptagning på inom 5 % av gruppens medelvärde väljs ut slumpmässigt för mätning av urlakningen.

FÖRFARANDE FÖR MÄTNINGAR AV TRÄSKYDDSMEDELS-UTSLÄPP

Doppmetoden

34. Testexemplaren vägs och nedsänks därefter helt i vattnet, och datum och tidpunkt registreras. Behållaren täcks för att minska avdunstningen.

35. Vattnet byts ut vid följande tidpunkter: 6 timmar, 1 dag, 2 dagar, 4 dagar, 8 dagar, 15 dagar, 22 dagar, 29 dagar (obs! detta är totala tider, inte intervallens längd). Tid och datum för vattenbyte och massan av det vatten som återfås från behållaren ska registreras.

36. Efter varje vattenbyte behåller man ett vattenprov i vilket man har doppat uppsättningen provexemplar för påföljande kemisk analys.

37. Provtagningsförfarandet möjliggör beräkning av profilen för mängden utsläpp mot tiden. Proven ska förvaras under förhållanden som bevarar analyten, t.ex. i ett kylskåp i mörker för att minska den mikrobiella tillväxten i provet före analys.

UTSLÄPPSMÄTNINGAR

Behandlade prover

38. Det insamlade vattnet analyseras kemiskt med avseende på det verksamma ämnet och/eller dithörande nedbrytnings- och omvandlingsprodukter, om så är lämpligt.

Obehandlade prover

39. Uppsamling av vatten (emissat) i detta system och därpå följande analys av kemikalier som har urlakats från de obehandlade virkesproverna gör det möjligt att uppskatta utsläppsmängden träskyddsmedel från obehandlat virke. Insamling och analys av emissatet efter ökande exponeringstider gör det möjligt att uppskatta förändringar i utsläppsmängden över tiden. Denna analys är ett kontrollförfarande som fastställer bakgrundsnivåerna av testkemikalien i obehandlat trä för att bekräfta att det virke som används som källa för proven inte tidigare har behandlats med träskyddsmedel.

DATA OCH RAPPORTERING

Kemiska analyser

40. Det uppsamlade vattnet analyseras kemiskt och resultatet från vattenanalysen uttrycks i lämpliga enheter, t.ex. µg/l.

Datarapportering

41. Alla resultat ska registreras. I tillägget visas ett exempel på ett förslag till formulär för registrering av en uppsättning behandlade provexemplar, och en sammanfattande tabell för beräkning av de genomsnittliga utsläppsvärdena under varje provtagningsintervall.

42. Det dagliga utsläppsflödet i mg/m^2/dag beräknas genom att man tar medelvärdet för de tre mätningarna från de tre replikaten och dividerar det med antalet dagar som träet har legat i vattnet.

▼M6

Testrapport

43. Testrapporten ska innehålla åtminstone följande information:

— namnet på leverantören av det testade skyddsmedlet,

— det särskilda och unika namnet eller koden för det testade skyddsmedlet,

— handelsnamnet eller trivialnamnet på den eller de aktiva beståndsdelarna med en allmän beskrivning av tillsatsämnen (t.ex. hjälplösningsmedel, harts) och ingrediensernas sammansättning i % m/m,

— den relevanta upptagningen eller mättnaden (i kg/m^3 respektive l/m^2) som anges för trä som används i kontakt med vatten,

— det träslag som används, med dess densitet, och tillväxthastigheten i ringar per 10 mm,

— mättnaden eller upptagningen av det testade skyddsmedlet och den formel som används för att beräkna upptagningen, uttryckt i l/m^2 eller kg/m^3,

— appliceringsmetoden för skyddsmedlet, med uppgift om det använda behandlingsschemat om en impregneringsprocess har använts, och appliceringsmetoden om en ytbehandling har använts,

— appliceringsdatum för skyddsmedlet, och en uppskattning av fukthalten i provexemplaren, uttryckt i procent,

— de konditioneringsförfaranden som har används, med uppgift om typ, betingelser och varaktighet,

— uppgift om den försegling av ändträet som har använts och det antal gånger den har applicerats,

— uppgift om eventuell efterföljande behandling av träet, t.ex. uppgift om leverantören, typ, kännetecken och mättnad av en färg,

— tid och datum för varje doppning, den mängd doppningsvatten som använts vid varje doppning av provexemplaren, och den mängd vatten som absorberats av träet under den tid som doppningen varar,

— alla avvikelser från den beskrivna metoden och eventuella faktorer som kan ha påverkat resultaten.

LITTERATUR

(1) Europeisk standard EN 84:1997. Träskydd – Accelererad åldring av träskyddsbehandlat virke före biologisk provning – Laboratoriemetod.

(2) Europeisk standard EN 113/A1:2004. Träskydd – Bestämning av den förebyggande skyddseffekten hos träskyddsmedel mot rötsvampar – Provning.

(3) Europeisk standard EN 252:1989. Träskydd – Bestämning av den relativa förebyggande skyddseffekten hos ett träskyddsmedel i markkontakt – Fältprovning

(4) Europeisk standard, EN 335 – Del 1: 2006. Träskydd – Definition av riskklasser avseende biologiska angrepp – Del 1: Allmänt.

(5) American Society for Testing and Materials standard, 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

Tillägg 1

Datablankett för testmetoden

Uppskattning av utsläpp från träskyddsbehandlat virke till miljön: laboratoriemetod för träbaserade råvaror som inte är täckta och som är i kontakt med sötvatten eller havsvatten

Provningslaboratorium	

Träskyddsmedel

Träskyddsmedlets leverantör	
Träskyddsmedlets särskilda och unika namn eller kod	
Träskyddsmedlets handels- eller trivialnamn	
Tillsatsämnen	
Den relevanta upptagningen för trä som används i kontakt med vatten	

Applicering

Appliceringsmetod	
Datum för applicering	
Formel som används för att beräkna upptagningen:	
Konditioneringsförfarande	
Konditioneringens varaktighet	
Försegling av ändträet / antal gånger den applicerats	
Efterbehandling	(om tillämpligt)

Provexemplar

Träslag	
Träets densitet	(minsta värde … medelvärde … högsta värde)
Tillväxthastighet (ringar per 10 mm)	(minsta värde … medelvärde … högsta värde)
Fukthalt	

▼M6

Testkombinationer (*)	**Upptagning (t.ex. kg/m^3)**
Behandlat ”x”	Medelvärde och standardavvikelse för fem exemplar
Behandlat ”y”	Medelvärde och standardavvikelse för fem exemplar
Behandlat ”z”	Medelvärde och standardavvikelse för fem exemplar
Obehandlat	
Ändring av testmetodens parametrar	t.ex. vattenkvalitet, provexemplarens dimensioner, osv.

(*) x, y, z representerar de tre replikatproven

▼M6

Tid	Vattenbyte	Provmassa		Vattenupptagning		Vattenprov				
		Behandlat (medelvärde)	Obehandlat	Behandlat (medelvärde)	Obehandlat		Testvatten	x	y	z
	Datum	g	g	g	g	nr	pH-värde	pH-värde	pH-värde	pH-värde
start										
6 h						1				
24 h						2				
2 d.						3				
4 d.						4				
8 d.						5				
15 d.						6				
22 d.						7				
29 d.						8				

▼M6

V.g. fyll i separata tabeller för varje aktiv substans

Tid	Vattenbyte	Analysresultat															
		Obehandlade exemplar			Behandlade exemplar												
		Koncentration verksamt ämne i vatten mg/l	Utsläppskvantitet mg/m^2	Utsläppshastighet $mg/m^2/d$	Koncentration verksamt ämne i vatten				Utsläppskvantitet				Utsläppshastighet			
					x	y	z	Medel	x	y	z	Medel	x	y	z	Medel
	Datum				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 h																
24 h																
2 d.																
4 d.																
8 d.																
15 d.																
22 d.																
29 d.																

Anmärkning: Eftersom man kan behöva använda resultaten från obehandlade prover för att korrigera utsläppshastigheten från behandlade prover bör de obehandlade resultaten komma först och alla värden för behandlade prover blir då ”korrigerade värden”. En korrigering kan också behöva göras för den ursprungliga vattenundersökningen.

▼**M6**

Tillägg 2

Definitioner

Kemikalie: ett ämne eller en blandning

Testkemikalie: alla ämnen eller blandningar som testas med denna testmetod.

▼M6

C.46 BIOACKUMULERING I SEDIMENTLEVANDE BOTTENLEVANDE OLIGOCHAETER

INLEDNING

1. Den här testmetoden motsvarar OECD:s testriktlinje (TG) 315 (2008). Sedimentätande endobentiska djur kan exponeras för sedimentbundna ämnen (1). Bland dessa sedimentätare spelar vattenlevande oligochaeter (fåborstmaskar, Oligochaeta) en viktig roll på vattensystemens bottnar. De lever i sedimentet och är ofta den vanligaste arten, i synnerhet i livsmiljöer med miljöförhållanden som är ogynnsamma för andra djur. Genom bioomlagring av sedimentet och genom att utgöra byten kan oligochaeterna ha en stark inverkan på sedimentbundna ämnens biotillgänglighet för andra organismer, t.ex. bentivora fiskar. I motsats till epibentiska organismer gräver endobentiska vattenlevande oligochaeter ner sig i sedimentet, och förtär sedimentpartiklar under sedimentytan. På grund av detta exponeras dessa organismer för ämnen via många upptagningsvägar, inbegripet direktkontakt, förtäring av förorenade sedimentpartiklar, porvatten och överliggande vatten. Några arter av bottenlevande oligochaeter som för närvarande används för ekotoxikologisk testning beskrivs i tillägg 6.

2. De parametrar som kännetecknar bioackumuleringen av ett ämne omfattar först och främst bioackumuleringsfaktorn (BAF) och konstanterna för sedimentupptagningshastigheten (k_s) och elimineringshastigheten (k_e). Detaljerade definitioner av dessa parametrar finns i tillägg 1.

3. För att kunna bedöma bioackumuleringsförmågan hos ämnen i allmänhet, och undersöka bioackumuleringen av ämnen som tenderar att fördelas i eller på sedimentet, behövs en miljöspecifik testmetod (1) (2) (3) (4).

4. Denna testmetod är utformad för att bedöma bioackumuleringen av sedimentrelaterade ämnen i endobentiska oligochaeter. Testämnet spikas i sedimentet. Det spikade sedimentet är avsett att simulera ett förorenat sediment.

5. Denna metod baseras på befintliga testmetoder för sedimenttoxicitet och bioackumulering (1) (4) (5) (6) (7) (8) (9). Andra användbara dokument är diskussionerna och resultaten av en internationell workshop (11), och resultatet av ett internationellt ringtest (12).

6. Detta test gäller stabila, neutrala organiska ämnen som tenderar att förenas med sediment. Bioackumuleringen av sedimentrelaterade stabila metallorganiska föreningar kan också mätas med denna metod (12). Den är inte tillämplig på metaller och andra spårelement (11) utan ändring av testutformningen med avseende på substrat och vattenvolymer, och eventuellt storleken på vävnadsproverna.

NÖDVÄNDIGA FÖRUTSÄTTNINGAR FÖR OCH INFORMATION OM TESTÄMNET

7. För närvarande finns endast ett fåtal väl etablerade kvantitativa struktur-aktivitetssamband (QSAR) tillgängliga (14) rörande bioackumuleringsprocesser. Det mest allmänt använda sambandet är korrelationen mellan bioackumuleringen och biokoncentrationen av stabila organiska ämnen respektive deras lipofilicitet (uttryckt som logaritmen av variationskoefficienten oktanol/vatten (log K_{ow}); se tillägg 1 för definitioner), som har utarbetats för beskrivning av en ämnesfördelning mellan vatten och fisk. Korrelationer för

▼M6

sedimentdelen har också fastställts med hjälp av detta förhållande (15) (16) (17) (18). Korrelationen mellan log k_{ow} och log BCF som en viktig QSAR kan vara till hjälp för en första preliminär uppskattning av de sedimentrelaterade ämnenas bioackumuleringspotential. BAF kan dock påverkas av testorganismens fettinnehåll och sedimentets halt av organiskt kol. Därför kan fördelningskoefficienten organiskt kol/vatten (K_{oc}) också användas som en bestämmande faktor för bioackumuleringen av sedimentrelaterade organiska ämnen.

8. Detta test kan tillämpas på följande:

— stabila, organiska ämnen med log K_{ow}-värden mellan 3,0 och 6,0 (5) (19) och superlipofila ämnen som har ett log K_{ow}-värde på mer än 6,0 (5),

— ämnen som tillhör en klass av organiska ämnen som är kända för sin bioackumuleringspotential i levande organismer, t.ex. ytaktiva eller starkt adsorptiva ämnen (t.ex. hög K_{oc}).

9. Information om testämnet, t.ex. säkerhetsåtgärder, lämpliga lagringsförhållanden och stabilitet samt analysmetoder bör inhämtas innan studien inleds. Vägledning för testning av ämnen med fysikalisk-kemiska egenskaper som gör dem svåra att testa ges i (20) och (21). Innan man påbörjar ett bioackumuleringstest med vattenlevande oligochaeter ska följande information om det undersökta ämnet finnas tillgänglig:

— trivialnamn, kemiskt namn (helst enligt IUPAC), strukturformel, CAS-nummer, renhet,

— löslighet i vatten (testmetod A.6 (22)),

— fördelningskoefficient oktanol/vatten, K_{ow} (testmetoderna A.8, A.24 (22)),

— fördelningskoefficient sediment/vatten, uttryckt som K_d eller K_{oc} (testmetod C.19 (22)),

— hydrolys (testmetod C.7 (22)),

— fotolys i vatten (23),

— ångtryck (testmetod A.4 (22)),

— lätt bionedbrytbarhet (testmetoderna C.4 och C.29 (22)),

— ytspänning (testmetod A.5 (22)),

— kritisk micellkoncentration (24).

Dessutom är följande information tillämplig, om den finns tillgänglig:

— biologisk nedbrytning i vattenmiljön (testmetoderna C.24 och C.25 (22)),

— Henrys lags konstant.

10. Radioaktiv märkning av testämnen kan underlätta analysen av vatten- och sedimentprover samt biologiska prover och kan användas för att fastställa huruvida identifiering och kvantifiering av nedbrytningsprodukter bör utföras. Den metod som beskrivs här har validerats i ett internationellt ringtest (12) för ^{14}C-märkta ämnen. Om de totala radioaktiva resterna mäts, baseras bioackumuleringsfaktorn (BAF) på det ursprungliga ämnet inklusive eventuella kvarvarande nedbrytningsprodukter. Det är också möjligt att kombinera

▼M6

en metabolismstudie med en undersökning av bioackumuleringen genom en analys och kvantifiering av procentandelen av det ursprungliga ämnet och dess nedbrytningsprodukter i prov som tas vid slutet av upptagningsfasen eller vid bioackumuleringens högsta nivå. Det rekommenderas att beräkning av BAF baseras på det ursprungliga ämnets koncentration i organismerna och inte endast på de totala radioaktiva resterna.

11. Den information som behövs, utöver testämnets egenskaper, är giftigheten för de arter av oligochaeter som används i testet, t.ex. den dödliga medankoncentrationen (LC_{50}) för den tid som krävs för upptagningsfasen, för att se till att de valda exponeringskoncentrationerna är mycket lägre än de toxiska nivåerna. Man bör först och främst använda toxicitetsvärden från långvariga studier om subletala endpoints (EC_{50}), om sådana finns att tillgå. Om sådana uppgifter inte finns tillgängliga kan ett akut toxicitetstest under betingelser som är identiska med betingelserna i bioackumuleringstestet, eller data rörande toxiciteten för andra alternativa arter, ge användbar information.

12. En lämplig analysmetod med känd noggrannhet, precision och känslighet för kvantifiering av ämnet i testlösningarna, i sedimentet och i det biologiska materialet måste finnas tillgänglig, tillsammans med uppgifter om beredning och lagring av prover såväl som med säkerhetsdatablad. De analytiska detektionsgränserna för testämnet i vatten, sediment och maskvävnad bör också vara kända. Om ett radioaktivt märkt testämne används måste den specifika radioaktiviteten (dvs. Bq mol^{-1}), placeringen av den radioaktivt märkta atomen, och den procentuella andelen radioaktivitet associerad med orenheter vara kända. Testämnets specifika radioaktivitet bör vara så hög som möjligt i syfte att påvisa så låga testkoncentrationer som möjligt (11).

13. Information om egenskaperna hos det sediment som ska användas (t.ex. sedimentets ursprung eller beståndsdelar, pH-värde och porvattnets koncentration av ammoniak (sediment från fältet), halt av organiskt kol (TOC), partikelstorleksfördelning (procent sand, silt och lera) och procent torrvikt) bör finnas tillgänglig (6).

PRINCIP FÖR TESTMETODEN

14. Testet består av två faser: upptagningsfasen (exponeringsfasen) och elimineringsfasen (post-exponeringsfasen). Under upptagningsfasen exponeras maskarna för sediment som spikats med testämnet, varefter systemet fyllts på med rekonstituerat vatten och bringats i jämvikt på det sätt som är lämpligt (11). Kontrollgrupper med maskar hålls under identiska förhållanden utan testämnet.

15. För elimineringsfasen överförs maskarna till ett sediment-vatten-system som är fritt från testämnet. En elimineringsfas är nödvändig för att man ska få information om hastigheten med vilken testämnet utsöndras av testorganismerna (19) (25). En elimineringsfas krävs alltid, med undantag för om upptaget av testämne under exponeringen har varit obetydligt (till exempel om det inte finns någon statistisk skillnad mellan koncentrationen av testämnet i testmaskarna och kontrollmaskarna). Om ett stabilt tillstånd inte har uppnåtts under upptagningsfasen bör bestämningen av de kinetiska värdena – BAF_k samt konstanterna för upptagnings- och elimineringshastigheterna – göras med hjälp av resultaten från elimineringsfasen. Förändringar i testämnets koncentration i/på maskarna kontrolleras under testets båda faser.

16. Under upptagningsfasen görs mätningar till dess att BAF har nått en platå eller ett stabilt tillstånd. Som standard ska upptagningsfasen vara 28 dagar. Erfarenheten har visat att en 12- till 14-dagars upptagningsfas räcker för att flera stabila, neutrala organiska ämnen ska kunna uppnå ett stabilt tillstånd (6) (8) (9).

▼M6

17. Om ett stabilt tillstånd inte uppnås inom 28 dagar påbörjas elimineringsfasen genom att de exponerade oligochaeterna överförs till kärl som innehåller samma medium fast utan testämnet. Elimineringsfasen avslutas antingen när nivån på 10 % av koncentrationen uppmäts i maskarna på dag 28 av upptagningsfasen, eller efter en längsta varaktighet på 10 dagar. Nivån av rester i maskarna vid slutet av elimineringsfasen rapporteras som en ytterligare endpoint, dvs. som icke-eliminerade rester (NER). Bioackumuleringsfaktorn vid stabilt tillstånd (BAF_{ss}) beräknas helst både som kvoten mellan koncentrationen i maskarna (C_a) och i sedimentet (C_s) vid ett uppenbart stabilt tillstånd, och som en kinetisk bioackumuleringsfaktor (BAF_K) som kvoten mellan konstanterna för upptagningshastigheten från sedimentet (k_s) och elimineringshastigheten (k_e) utifrån ett antagande om första ordningens kinetik. Om ett stabilt tillstånd inte uppnås inom 28 dagar ska BAF_K beräknas utifrån konstanterna för upptagnings- och elimineringshastigheterna. För uträkning se tillägg 2. Om första ordningens kinetik inte är tillämplig ska mer komplexa modeller tillämpas (se tillägg 2 och hänvisning (25)).

18. Om ett stabilt tillstånd inte uppnås inom 28 dagar kan upptagningsfasen valfritt förlängas och de exponerade grupperna av maskar – om dessa finns tillgängliga – utsätts för ytterligare mätningar till dess att ett stabilt tillstånd uppnås. Parallellt med detta bör elimineringsfasen ändå påbörjas på dag 28 av upptagningsfasen.

19. Konstanterna för upptagningshastigheten och elimineringshastigheten (eller konstanterna om mer komplexa modeller används), den kinetiska bioackumuleringsfaktorn (BAF_K), och, när så är möjligt, konfidensgränserna för var och en av dessa parametrar beräknas utifrån datoriserade modellekvationer (se tillägg 2 för modeller). Anpassningsgraden (”goodness of fit”) för valfri modell kan bestämmas utifrån korrelationskoefficienten eller determinationskoefficienten (koefficienter nära 1 tyder på hög anpassningsgrad).

20. För att minska variationen i testresultaten för organiska ämnen med hög lipofilicitet bör bioackumuleringsfaktorerna dessutom uttryckas i förhållande till fettinnehållet i testorganismerna och till halten av organiskt kol (TOC) i sedimentet (ackumuleringsfaktorn biota/sediment eller BSAF i kg sediment TOC kg^{-1} fettinnehåll i mask). Detta tillvägagångssätt grundar sig på erfarenheter och teoretiska korrelationer rörande vattenmiljön, där det – för vissa kemiska klasser – finns ett klart samband mellan ett ämnes bioackumuleringsförmåga och dess lipofilicitet, vilket har klart etablerats för fisk som modellorganismer (14) (25) (27). Det finns också ett förhållande mellan fettinnehållet i den undersökta fisken och den observerade bioackumuleringen av sådana ämnen. För bottenlevande organismer har man funnit liknande korrelationer (15) (16) (17) (18). Om tillräcklig mängd maskvävnad finns att tillgå, kan testdjurens fettinnehåll bestämmas utifrån samma biologiska material som används för bestämning av testämnets koncentration. Emellertid är det praktiskt att använda acklimatiserade kontrolldjur åtminstone i början eller – företrädesvis – i slutet av upptagningsfasen för att mäta fettinnehållet, som sedan kan användas för att normalisera BAF-värdena.

TESTETS GILTIGHET

21. För att ett test ska vara giltigt måste följande villkor uppfyllas:

— Maskarnas kumulativa dödlighet (kontroller och behandlingar) vid testets slut bör inte överstiga 20 % av det ursprungliga antalet.

— Dessutom bör det påvisas att maskarna gräver sig igenom i sedimentet så att maximal exponering möjliggörs. För mer om detta, se punkt 28.

▼M6

BESKRIVNING AV TESTMETODEN

Testarter

22. Flera arter vattenlevande oligochaeter kan användas för testet. De oftast använda arterna anges i tillägg 6.

23. Toxicitetstester (96 timmar, endast i vatten) bör genomföras regelbundet (t.ex. varje månad) med ett referensgiftämne såsom kaliumklorid (KCl) eller kopparsulfat ($CuSO_4$) (1) för att visa på hälsotillståndet hos försöksdjuren (1) (6). Om man inte regelbundet utför referenstoxicitetstester bör uppsättningen organismer som ska användas i ett bioackumuleringstest för sediment kontrolleras med hjälp av ett referensgiftämne. En mätning av fettinnehållet kan också tillhandahålla värdefull information om djurens tillstånd.

Odling av testorganismerna

24. För att man ska få ett tillräckligt antal maskar för bioackumuleringstest kan man behöva hålla maskarna permanent i en laboratorieodling med en enda art. Laboratorieodlingsmetoder för de utvalda djurarterna sammanfattas i tillägg 6. För närmare upplysningar se hänvisningarna (8) (9) (10) (18) (28) (29) (30) (31) (32).

Utrustning

25. Man bör vara noga med att i alla delar av utrustningen undvika användningen av material som kan lösas upp, absorbera testämnen eller laka ut andra ämnen och ha negativa effekter på försöksdjuren. Vanliga rektangulära eller cylindriska behållare, tillverkade av kemiskt inert material och med lämplig kapacitet i enlighet med djurtätheten, dvs. antalet testmaskar, kan användas. Man bör undvika att använda mjuka plaströr för tillsats av vatten eller luft. Polytetrafluoreten, rostfritt stål och/eller glas bör användas för utrustning som kommer i kontakt med testmediet. För ämnen med höga adsorptionskoefficienter, såsom syntetiska pyretroider, kan det vara nödvändigt att använda silaniserat glas. I sådana situationer måste utrustningen kasseras efter användning (5). För radioaktivt märkta testämnen och flyktiga ämnen bör man undvika avdrivning till luft (strippning) och läckage av strippat testämne. Man bör använda fällor (t.ex. gastvättflaskor av glas) som innehåller lämpliga absorbenter som håller kvar eventuella rester som avdunstar från testbehållarna (11).

Vatten

26. Det överliggande vattnet måste vara av en kvalitet som möjliggör testartens överlevnad under acklimatiserings- och testperioderna utan att djuren uppvisar onormala förändringar eller onormalt beteende. Rekonstituerat vatten enligt testmetod C.1 (25) rekommenderas som överliggande vatten i testerna samt i laboratoriekulturerna med maskar. Det har visats att flera olika testarter kan överleva, växa och föröka sig i detta vatten (8), och det ger även maximal standardisering och maximala odlingsbetingelser. Vattnet ska beskrivas åtminstone med pH-värde, konduktivitet och hårdhet. Analys av vattnet med avseende på mikroföroreningar kan ge användbar information (tillägg 4).

27. Vattnet bör hålla jämn kvalitet under hela testet. pH-värdet i det överliggande vattnet bör vara mellan 6 och 9. Den totala hårdheten bör vara mellan 90 och 400 mg $CaCO_3$ per liter vid testets början (7). Intervaller för pH och vattenhårdhet i det nämnda rekonstituerade vattnet anges i testmetod C.1

▼M6

(25). Om det förekommer växelverkan mellan hårdhetsjoner och testämnet bör vatten med lägre hårdhet användas. I tillägg 4 sammanfattas ytterligare kriterier för acceptabelt utspädningsvatten enligt OECD TG 210 (34).

Sediment

28. Sedimentet måste hålla en kvalitet som möjliggör testorganismernas överlevnad och helst förökning under acklimatiserings- och testperioderna utan att djuren uppvisar onormala förändringar eller onormalt beteende. Maskarna bör gräva ner sig i sedimentet. Grävbeteendet kan påverka exponeringen, och därmed också BAF-värdet. Därför bör undvikande av sedimentet eller testorganismernas grävbeteende registreras, om grumligheten i det överliggande vattnet tillåter sådana observationer. Maskarna (i kontroll och behandlingar) bör gräva ner sig i sedimentet inom 24 timmar efter att de har släppts ner i testkärlen. Om man observerar permanent undvikande av sedimentet eller avsaknad av grävbeteende (t.ex. över 20 % under mer än hälften av upptagningsfasen), tyder detta på att testbetingelserna är olämpliga eller att testorganismerna inte är friska, eller att koncentrationen av testämnet framkallar detta beteende. I ett sådant fall bör testet avbrytas och upprepas vid förbättrade betingelser. Ytterligare information om sedimentförtäring kan fås med hjälp av metoder som beskrivs i (35) (36), vilka närmare anger testorganismernas sedimentförtäring eller partikelval. Om man observerar närvaro eller frånvaro av fekala pelletar på sedimentytan, vilka tyder på maskarnas sedimentförtäring, bör detta registreras och beaktas vid tolkningen av testresultaten med avseende på exponeringsvägar.

29. Ett syntetiskt sediment baserat på den syntetiska jord som beskrivs i testmetod C.8 (40) rekommenderas för användning både i testerna och laboratoriekulturerna med maskar (tillägg 5), eftersom naturliga sediment av lämplig kvalitet inte alltid finns att tillgå under hela året. Dessutom kan naturligt förekommande organismer och den eventuella närvaron av mikroföroreningar i naturliga sediment påverka testet. Flera olika testarter kan överleva, växa och föröka sig i syntetiskt sediment (8).

30. För syntetiskt sediment bör man minst ange beståndsdelarnas ursprung, kornstorleksfördelning (procentandel sand, silt och lera), halt av organiskt kol (TOC), vattenhalt och pH-värde. Mätning av redoxpotentialen är valfri. Naturligt sediment från oförorenade platser kan dock användas som test- och/eller odlingssediment (1). För naturliga sediment bör minst anges ursprung (insamlingsplats), pH-värde och ammoniak i porvattnet, halt av organiskt kol (TOC), partikelstorleksfördelning (procent sand, silt och lera) och den procentuella vattenhalten (6). Om man förväntar sig utveckling av ammoniak rekommenderas att det naturliga sedimentet, innan det spikas med testämnet, konditioneras i sju dagar under samma betingelser som råder i det efterföljande testet. I slutet av denna konditioneringsperiod bör det överliggande vattnet avlägsnas och kasseras. En analys av sedimentet eller dess beståndsdelar med avseende på mikroföroreningar kan ge användbar information före användningen.

Beredning

31. Hantering av naturliga sediment innan de används i laboratoriet beskrivs i (1) (6) (44). Beredning av syntetiskt sediment beskrivs i tillägg 5.

▼M6

Lagring

32. Lagringen av naturliga sediment i laboratoriet bör vara så kortvarig som möjligt. Den amerikanska miljöskyddsmyndigheten (EPA) (6) rekommenderar en maximal lagringsperiod på åtta veckor vid 4 ± 2 °C i mörker. Det bör inte finnas något gasutrymme ovanför sedimentet i lagringsbehållarna. Rekommendationer för lagring av syntetiskt sediment anges i tillägg 5.

Applicering av testämnet

33. Sedimentet spikas med testämnet. Spikningsförfarandet omfattar beläggning av en eller flera av sedimentets beståndsdelar med testämnet. Till exempel kan kvartssanden, eller en del därav (t.ex. 10 g kvartssand per testkärl), indränkas med en lösning av testämnet i lämpligt lösningsmedel, som sedan långsamt får avdunsta tills det har torkat bort. Därefter kan den belagda fraktionen blandas ner i det våta sedimentet. Mängden sand som följer med i blandningen av testämne och sand måste beaktas vid beredningen av sedimentet (dvs. sedimentet ska således beredas med mindre mängd sand (6)).

34. Med naturligt sediment kan testämnet tillsättas genom spikning av en torkad del av sedimentet enligt beskrivning ovan för syntetiskt sediment, eller genom att blanda ner testämnet i det våta sedimentet, och därefter låta det solubiliseringsmedel som eventuellt använts avdunsta. Lämpliga lösningsmedel för spikning av vått sediment är etanol, metanol, etylenglykolmonometyleter, etylenglykoldimetyleter, dimetylformamid och trietylenglykol (5) (34). Lösningsmedlets toxicitet och flyktighet samt testämnets löslighet i det valda lösningsmedlet bör vara de huvudsakliga kriterierna vid valet av ett lämpligt solubiliseringsmedel. Ytterligare vägledning om spikningsförfaranden finns i Environment Canada (1995) (41). Det är viktigt att se till att testämnet som tillsätts sedimentet fördelas omsorgsfullt och jämnt i sedimentet. Man bör analysera replikatdelprover av det spikade sedimentet för att kontrollera testämnets koncentrationer i sedimentet, och för att fastställa graden av homogenitet för testämnets distribution.

35. Efter att det spikade sedimentet med överliggande vatten har beretts rekommenderas att man låter testämnet fördelas mellan sediment- och vattenfaserna. Detta bör helst göras under samma temperatur- och luftningsbetingelser som används i testet. Den lämpliga stabiliseringstiden beror på sedimentet och testämnet och kan vara i storleksordningen några timmar upp till flera dagar, och i sällsynta fall upp till flera veckor (4–5 veckor) (28) (42). I detta test förväntar man inte att jämvikt ska uppnås, men en stabiliseringstid på 48 timmar till 7 dagar rekommenderas. Beroende på syftet med studien, t.ex. om man ska efterlikna vissa miljöförhållanden, kan det spikade sedimentet stabiliseras eller åldras under en längre period (11).

TESTFÖRFARANDE

Preliminärt test

36. Det kan vara lämpligt att utföra ett preliminärt test för att optimera testbetingelserna i det slutgiltiga testet, t.ex. val av testämneskoncentration och längd på upptagnings- och elimineringsfaserna. Maskarnas beteende, t.ex. undvikande av sedimentet, dvs. att maskarna flyr från sedimentet, något som kan orsakas av testämnet och/eller sedimentet i sig, bör observeras

▼M6

och registreras under ett preliminärt test. Undvikande av sedimentet kan också användas som en subletal parameter i ett preliminärt test för att uppskatta den eller de testämneskoncentrationer som ska användas i ett bioackumuleringstest.

Exponeringsförhållanden

Upptagningsfasens längd

37. Testorganismerna exponeras för testämnet under upptagningsfasen. Den första provtagningen bör göras 4–24 timmar efter upptagningsfasens början. Upptagningsfasen ska vara i upp till 28 dagar (1) (6) (11), såvida man inte kan visa att jämvikt har uppnåtts tidigare. Ett stabilt tillstånd inträffar när (i) en plott av bioackumuleringsfaktorerna vid varje provtagningsperiod mot tiden är parallell med tidsaxeln, (ii) tre på varandra följande analyser av BAF på prover som har tagits med intervaller på minst två dagar inte varierar med mer än ± 20 % jämfört med varandra, och (iii) det inte finns några betydande skillnader mellan de tre provtagningsperioderna (baserat på statistiska jämförelser, t.ex. variansanalys och regressionsanalys). Om ett stabilt tillstånd inte har uppnåtts inom 28 dagar kan upptagningsfasen avslutas genom att starta elimineringsfasen, och BAF_K kan beräknas utifrån konstanterna för upptagnings- och elimineringshastigheterna (se även punkterna 16–18).

Elimineringsfasens varaktighet

38. Det första provet bör tas 4–24 timmar efter elimineringsfasens början, eftersom snabba förändringar av resterna i vävnaderna kan förekomma under den inledande perioden. Det rekommenderas att man avslutar elimineringsfasen antingen när testämneskoncentrationen är mindre än 10 % av koncentrationen vid stabilt tillstånd, eller efter en period på högst tio dagar. Nivån av rester i maskarna vid slutet av elimineringsfasen rapporteras som en sekundär endpoint. Periodens längd bör emellertid styras utifrån längden på den period under vilken koncentrationen av testämnet i maskarna ligger kvar över analysmetodens detektionsgräns.

Testorganismer

Antalet testmaskar

39. Antalet maskar per prov måste tillhandahålla en tillräcklig mängd maskvävnad så att massan av testämnet per prov i början av upptagningsfasen respektive vid slutet av elimineringsfasen är betydligt högre än detektionsgränsen för testämnet i biologiskt material. I de nämnda stadierna av upptagnings- och elimineringsfaserna är koncentrationen i försöksdjuren ofta relativt låg (6) (8) (18). Eftersom vikten av varje enskild individ är mycket låg i många arter av vattenlevande oligochaeter (5–10 mg våtvikt per individ för *Lumbriculus variegatus* och *Tubifex tubifex*), kan maskarna i en given replikattestbehållare läggas samman för vägning och analys av testkemikalien. För testarter med högre individuell vikt (t.ex. *Branchiura sowerbyi*) kan replikat med en enda individ användas, men i sådana fall bör antalet replikat utökas till fem per provtagningsplats (11). Det bör dock noteras att *B. sowerbyi* inte ingick i ringtestet (12), och därför inte rekommenderas som lämplig art i metoden.

40. Maskar av liknande storlek bör användas (för *L. variegatus* se tillägg 6). De bör komma från samma källa och vara vuxna eller stora djur i samma åldersklass (se tillägg 6). Ett djurs vikt och ålder kan ha betydande inverkan på BAF-värdena (t.ex. beroende på varierande fettinnehåll och/eller förekomsten av ägg). Dessa parametrar bör registreras noggrant. För att mäta den genomsnittliga våt- och torrvikten bör delprov med maskar vägas innan testet inleds.

▼M6

41. Man kan förvänta sig att *Tubifex tubifex* och *Lumbriculus variegatus* förökar sig under testperioden. En brist på förökning i ett bioackumuleringstest bör registreras och beaktas vid tolkningen av testresultaten.

Djurtäthet

42. Höga förhållanden mellan vatten och maskar samt sediment och maskar bör användas för att minimera minskningen av testämneskoncentrationen i sedimentet under upptagningsfasen, och för att undvika en ökning av halten löst syre. Den valda djurtätheten bör också överensstämma med den valda artens naturligt förekommande populationstäthet (43). För *Tubifex tubifex* rekommenderas till exempel en djurtäthet på 1–4 mg maskvävnad (våtvikt) per gram vått sediment (8) (11). Hänvisningarna (1) och (6) rekommenderar en djurtäthet på ≤ 1 g torrvikt maskvävnad per 50 g organiskt kol i sedimentet för *L. variegatus*.

43. Maskar som används i ett test avlägsnas från odlingen genom siktning av odlingssedimentet. Djuren (vuxna eller stora maskar som inte visar tecken på att nyligen ha delats) överförs till glaskärl (t.ex. petriskålar) som innehåller rent vatten. Om testbetingelserna avviker från odlingsbetingelserna bör en acklimatiseringsfas på 24 timmar vara tillräcklig. Före vägningen ska överskottsvatten avlägsnas från maskarna. Detta kan göras genom att försiktigt lägga maskarna på förhandsfuktat mjukt papper. Det är inte lämpligt att använda absorberande papper för att torka maskarna eftersom detta kan orsaka stress och skador på maskarna. Brunson m.fl. (1998) rekommenderar att man använder icke avtorkade maskar med en vikt på ungefär 1,33 gånger den eftersträvade biomassan. Dessa ytterligare 33 % motsvarar skillnaden mellan avtorkade och icke avtorkade maskar (28).

44. I början av upptagningsfasen (testdag 0) avlägsnas testorganismerna från acklimatiseringsbehållaren och fördelas slumpmässigt i kärl (t.ex. petriskålar) som innehåller rekonstituerat vatten genom att man tillsätter maskarna två och två i varje kärl tills varje kärl innehåller tio maskar. Var och en av dessa grupper av maskar överförs sedan slumpmässigt till separata testkärl, t.ex. med hjälp av en mjuk stålpincett. Testkärlen inkuberas sedan under testbetingelserna.

Utfodring

45. Med hänsyn till det låga näringsvärdet i syntetiskt sediment bör man lägga till en foderkälla i sedimentet. För att inte underskatta exponeringen av testorganismerna, t.ex. genom att selektivt utfodra dem med icke-förorenat foder, bör det foder som krävs för testorganismernas reproduktion och tillväxt tillsättas i sedimentet en gång före eller under appliceringen av testämnet (se tillägg 5).

Förhållandet mellan sediment och vatten

46. Den rekommenderade förhållandet mellan sediment och vatten är 1:4 (45). Detta förhållande anses vara lämpligt för att syrgaskoncentrationerna ska hållas på lämplig nivå, och för att undvika ackumulering av ammoniak i det överliggande vattnet. Syrehalten i det överliggande vattnet bör hållas på ≥ 40 % mättnad. Det överliggande vattnet i testkärlen bör försiktigt luftas (t.ex. 2–4 bubblor per sekund) genom en pasteurpipett placerad ca 2 cm ovanför sedimentytan för att minimera grumlingen av sedimentet.

▼M6

Ljus och temperatur

47. Ljusperioden i odlingen och testet är 16 timmar (1) (6). Ljusintensiteten i testområdet ska ligga på omkring 500–1 000 lux. Temperaturen bör vara 20 ± 2 °C under hela testet.

Testkoncentrationer

48. En enda testkoncentration (så låg som möjligt) används för bestämning av upptagningskinetiken, men en andra (högre) koncentration kan användas (t.ex. (46)). I detta fall ska prover tas och analyseras vid ett stabilt tillstånd eller efter 28 dagar för att bekräfta de BAF-värden som uppmätts vid den lägre koncentrationen (11). Den högre koncentrationen bör väljas så att negativa effekter kan uteslutas (exempelvis genom att man väljer ungefär 1 % av den lägsta kända koncentrationen vid vilken kroniska effekter har observeras (EC_x), vilken erhålls från relevanta studier av kronisk toxicitet). Den lägre testkoncentrationen bör vara betydligt högre än detektionsgränsen i sedimentproverna och de biologiska proverna enligt den analysmetod som används. Om testämneskoncentrationen ligger nära den analytiska detektionsgränsen rekommenderas användning av ett radioaktivt märkt testämne med hög specifik radioaktivitet.

Behandlat replikat och kontrollreplikat

49. Det minsta antalet behandlade replikat för kinetiska mätningar bör vara tre per provtagningsplats (11) under hela upptagnings- och elimineringsfaserna. Ytterligare replikat bör användas, t.ex. för ytterligare valfria provtagningstillfällen. För elimineringsfasen bereds ett motsvarande antal replikat med icke-spikat sediment och överliggande vatten, så att de behandlade maskarna kan överföras från utsedda behandlade kärl till obehandlade kärl vid slutet av upptagningsfasen. Det totala antalet behandlade replikat bör vara tillräckligt stort för både upptagnings- och elimineringsfaserna.

50. Alternativt kan maskarna som valts ut för provtagning under elimineringsfasen exponeras i en stor behållare som innehåller spikat sediment från samma sats som används för upptagningskinetiken. Det bör visas att testförhållandena (t.ex. sedimentets djup, förhållandet mellan sediment och vatten, djurtäthet, temperatur, vattenkvalitet) är jämförbara med de replikat som valts ut för upptagningsfasen. Vid slutet av upptagningsfasen bör vatten-, sediment- och maskprover tas från denna behållare för analys, och ett tillräckligt antal stora maskar som inte visar några tecken på att nyligen ha delats bör försiktigt avlägsnas och överföras till de replikat som beretts för elimineringsfasen (t.ex. 10 organismer per replikatkärl).

51. Om inget annat lösningsmedel än vatten används bör minst nio replikat av en negativ kontroll (minst tre där prover tagits i början, tre i slutet av upptagningsfasen och tre i slutet av elimineringsfasen) tillhandahållas för biologisk analys och bakgrundsanalys. Om ett solubiliseringsmedel används för applicering av testämnet bör en lösningsmedelskontroll utföras (prover bör tas från minst tre replikat i början, tre i slutet av upptagningsfasen och tre i slutet av elimineringsfasen). I sådana fall ska minst fyra replikat av en negativ kontroll (inget lösningsmedel) tillhandahållas för provtagning i slutet av upptagningsfasen. Dessa replikat kan jämföras biologiskt med lösningsmedelskontrollen för att få information om lösningsmedlets eventuella effekter på testorganismerna. Närmare uppgifter finns i tillägg 3.

▼M6

Frekvens för mätningar av vattenkvaliteten

52. Åtminstone följande parametrar för vattenkvalitet bör mätas i det överliggande vattnet under upptagnings- och elimineringsfaserna:

Temperatur	i ett kärl för varje behandlingsnivå per provtagningsdatum, och i ett kontrollkärl en gång per vecka och i början och slutet av upptagnings- och elimineringsperioderna; temperatur i det omgivande mediet (den omgivande luften eller ett vattenbad) eller i ett representativt testkärl kan också registreras, t.ex. kontinuerligt eller med timslånga mellanrum,
Halten av löst syre	i ett kärl för varje behandlingsnivå, och i ett kontrollkärl per provtagningsdatum, uttryckt i mg/l och % av luftmättnadsvärdet (ASV),
Lufttillförsel	kontrolleras minst en gång per dag (arbetsdagar) och justeras vid behov,
pH-värde	i ett behandlat kärl för varje behandlingsnivå per provtagningsdatum, och i ett kontrollkärl en gång per vecka och i början och slutet av upptagnings- och elimineringsperioderna,
Total vattenhårdhet	i minst ett behandlat kärl och ett kontrolltestkärl vid början och slutet av upptagnings- och elimineringsfasen, uttryckt i mg/l $CaCO_3$,
Total ammoniakhalt	i minst ett behandlat kärl och ett kontrolltestkärl vid början och slutet av upptagnings- och elimineringsfasen, uttryckt i NH_4^+ eller NH_3 eller total mängd ammoniak-N.

Provtagning och analys av maskar, sediment och vatten

Schema för provtagning

53. Exempel på provtagningsschema för en 28-dagars upptagningsfas och en 10-dagars elimineringsfas finns i tillägg 3.

54. Ta prover på vattnet och sedimentet i testkärlen för bestämning av testämnets koncentration före maskarna tillsätts, och under både upptagnings- och elimineringsfaserna. Under testets gång bestäms testämnets koncentrationer i maskarna, sedimentet och vattnet i syfte att övervaka fördelningen av testämnet i de olika delarna av testsystemet.

55. Ta prover av maskarna, sedimentet och vattnet vid minst sex tillfällen under upptagnings- och elimineringsfaserna.

56. Fortsätt provtagningen till dess att en platå (stabilt tillstånd) har uppnåtts (se tillägg 1) eller i 28 dagar. Påbörja elimineringsfasen om platån inte har uppnåtts inom 28 dagar. När elimineringsfasen påbörjas överförs de utsedda maskarna till replikatbehållare som innehåller obehandlat sediment och vatten (se även punkterna 17 och 18).

Provtagning och provberedning

57. Ta vattenprover genom dekantering, avtappning med en hävert eller pipettering av en tillräcklig volym för att kunna fastställa kvantiteten av testämnet i provet.

58. Det återstående överliggande vattnet dekanteras noggrant eller tappas av med en hävert från provbehållaren eller -behållarna. Sedimentprover bör tas försiktigt, för att orsaka minsta möjliga störning av maskarna.

▼M6

59. Avlägsna alla maskar från testreplikatet vid provtagningstillfället, t.ex. genom att suspendera sedimentet med överliggande vatten, sprida ut innehållet i varje replikat på en grund bricka och plocka upp maskarna med en mjuk stålpincett. Skölj dem snabbt i vatten på en grund glas- eller stålbricka. Avlägsna överflödigt vatten. Överför maskarna försiktigt till ett förhandsvägt kärl och väg dem. Avliva maskarna genom frysning (t.ex. ≤ –18 °C). Förekomsten av och antalet kokonger och/eller juveniler bör registreras.

60. I allmänhet bör maskarna avlivas och vägas omedelbart efter provtagningen utan en tarmtömningsfas för att man ska erhålla ett lågt räknat BAF-värde som omfattar förorenat tarminnehåll, och för att undvika förluster av rester i kroppen under en eventuell tarmtömningsfas i endast vatten (8). Ämnen med log K_{ow} på över 5 förväntas inte elimineras betydligt under eventuella tarmtömningsperioder i endast vatten, medan betydande mängder av ämnen med log Kow på mindre än 4 kan gå förlorade (47).

61. Under elimineringsfasen tömmer maskarna sitt tarminnehåll i rent sediment. Det betyder att mätningar omedelbart före elimineringsfasen inkluderar förorenat tarmsediment, medan den största delen av det förorenade tarminnehållet kan antas ersättas med rent sediment efter de första 4–24 timmarna av elimineringsfasen (11) (47). Koncentrationen i maskarna i detta prov kan därför anses vara samma som koncentrationen i vävnad efter tarmtömning. För att beakta utspädningen av testämneskoncentrationen med oförorenat sediment under elimineringsfasen kan tarminnehållets vikt uppskattas från förhållandena mellan maskarnas våtvikt/askvikt eller maskarnas torrvikt/askvikt.

62. Om syftet med en särskild undersökning är att mäta biotillgängligheten och de verkliga resterna i testorganismernas vävnader bör åtminstone ett delprov av de behandlade djuren (t.ex. från tre ytterligare replikatkärl), som helst insamlas under ett stabilt tillstånd, vägas, laxeras i rent vatten under en period av sex timmar (47) och vägas igen före analysen. Uppgifterna om maskarnas vikt och kroppskoncentration i detta delprov kan sedan jämföras med värdena från olaxerade maskar. Maskarna som utsetts för mätning av elimineringen bör inte laxeras innan överflyttningen till rent sediment för att minimera den ökade stress som djuren utsätts för.

63. Helst ska vattnet, sedimentet och maskproverna analyseras omedelbart (dvs. inom 1–2 dagar) efter avlägsnandet för att förhindra nedbrytning eller andra förluster samt för att beräkna de ungefärliga värdena för upptagning och eliminering under testets gång. Mellananalyser förhindrar också förseningar när det gäller fastställandet av när platån har uppnåtts.

64. Om mellananalyser inte görs ska proverna förvaras under lämpliga förhållanden. Ta reda på stabiliteten och de lämpliga lagringsförhållandena rörande det aktuella testämnet innan studien inleds (t.ex. varaktighet och förvaringstemperatur, extraktionsmetoder osv.). Om inga sådana uppgifter finns tillgängliga och de bedöms vara nödvändiga kan spikade kontrollvävnader testas parallellt för att bestämma stabiliteten vid lagring.

Analysmetodens kvalitet

65. Eftersom hela proceduren i huvudsak styrs av noggrannheten, precisionen och känsligheten hos den analysmetod som används för testämnet ska man kontrollera experimentellt att den kemiska analysens precision och reproducerbarhet, samt utbytet av testämnet från vatten-, sediment- och maskprover, är tillfredsställande med den aktuella metoden. Kontrollera också

▼M6

att testämnet inte kan påvisas i kontrollbehållarna i koncentrationer som är högre än bakgrundskoncentrationen. Korrigera vid behov värdena för C_w, C_s och C_a för kontrollernas utbytes- och bakgrundsvärden. Hantera alla prover under hela testet på ett sådant sätt att förorening och förlust minimeras (t.ex. till följd av att testämnet adsorberas på provtagningsutrustningen).

66. Det totala utbytet, och utbytet av testämnet i maskar, sediment och, i förekommande fall, i fällor med absorbenter som fångar upp avdunstat testämne, bör registreras och rapporteras.

67. Eftersom användningen av radioaktivt märkta ämnen rekommenderas är det möjligt att analysera den totala radioaktiviteten (dvs. ursprungs- och nedbrytningsprodukter). Om det är analytiskt möjligt kan en kvantifiering av ursprungsämnet och nedbrytningsprodukterna vid ett stabilt tillstånd eller i slutet av upptagningsfasen ge viktig information. Om man avser att utföra sådana mätningar ska proven därefter underkastas lämpliga extraktionsmetoder så att det ursprungliga ämnet kan kvantifieras separat. Om en påvisad nedbrytningsprodukt utgör en betydande andel (t.ex. > 10 %) av radioaktiviteten som uppmätts i testorganismerna vid ett stabilt tillstånd eller i slutet av upptagningsfasen rekommenderas att man identifierar sådana nedbrytningsprodukter (5).

68. På grund av den låga biomassan för varje individ är det ofta inte möjligt att bestämma testämnets koncentration i varje enskild mask, såvida inte *Branchiura sowerbyi* (40–50 mg våtvikt per mask) används som försöksdjur (11). Därför är det godtagbart att lägga samman individerna som tagits som prov från ett givet testkärl, men detta begränsar de statistiska metoder som kan tillämpas på erhållna data. Om en viss statistisk metod och dess statistiska styrka är viktiga faktorer måste testet omfatta ett tillräckligt antal försöksdjur och/eller replikattestkärl för att tillgodose den önskade sammanläggningen, metoden och styrkan.

69. Det rekommenderas att BAF-värdet uttrycks både som en funktion av den totala våtvikten, den totala torrvikten och, när så krävs (t.ex. för starkt lipofila ämnen) som en funktion av fettinnehållet och sedimentets halt av organiskt kol (TOC). Lämpliga metoder ska användas för fastställandet av fettinnehållet (48) (49). Extraktionstekniken med kloroform/metanol (50) kan rekommenderas som standardmetod (48). För att undvika klorerade lösningsmedel bör dock en ringtestad modifiering av Bligh & Dyer-metoden (50) enligt beskrivningen i (51) användas. Eftersom de olika metoderna inte ger identiska värden (48), är det viktigt att beskriva den metod som använts. Om möjligt, dvs. om det finns tillräckligt med maskvävnad att tillgå, ska fettinnehållet mätas i samma prov eller extrakt som tagits fram för analys av testämnet, eftersom fettet ofta måste tas bort från extraktet innan det kan analyseras genom kromatografi (5). Emellertid är det praktiskt att använda acklimatiserade kontrolldjur åtminstone i början eller – företrädesvis – i slutet av upptagningsfasen för att mäta fettinnehållet, t.ex. i tre prover.

DATA OCH RAPPORTERING

Behandling av resultaten

70. Upptagningskurvan för testämnet fås genom att man i aritmetisk skala plottar koncentrationen av testämnet i/på maskarna under upptagningsfasen mot

▼M6

tiden. Om kurvan når en platå beräknar man BAF_{ss} vid stabilt tillstånd:

$$\frac{C_a \text{ vid stabilt tillstånd eller på dag 28 (medelvärde)}}{C_s \text{ vid stabilt tillstånd eller på dag 28 (medelvärde)}}$$

71. Fastställ den kinetiska bioackumuleringsfaktorn (BAFK) som kvoten ks/ke. Elimineringskonstanten (ke) bestäms i regel utifrån elimineringskurvan (dvs. en plott som visar koncentrationen av testämnet i maskarna under elimineringsfasen). Konstanten för upptagningshastigheten ks beräknas därefter utifrån upptagningskurvan för kinetiken. För att få fram BAFK och hastighetskonstanterna ks och ke rekommenderas datorstödda icke-linjära parameteruppskattningsmetoder (se tillägg 2). Om elimineringen uppenbart inte är av första ordningen bör mer komplexa modeller användas (25) (27) (52).

72. Ackumuleringsfaktorn biota/sediment (BSAF) bestäms genom att BAFK normaliseras för fettinnehållet i maskarna och sedimentets totala innehåll av organiskt kol.

Tolkning av resultaten

73. Resultaten bör tolkas med försiktighet när de uppmätta testkoncentrationerna ligger på nivåer nära den använda analysmetodens detektionsgräns.

74. Tydligt definierade upptagnings- och elimineringskurvor utgör en indikation på att uppmätta bioackumuleringsdata är av god kvalitet. Rent allmänt bör konfidensgränserna för BAF-värdena från väl utformade studier inte vara högre än 25 % (5).

Testrapport

75. Testrapporten måste innehålla följande information:

Testämne

— fysikalisk form och fysikalisk-kemiska egenskaper, t.ex. log K_{ow}, vattenlöslighet,

— kemiska identifieringsdata, testämnets källa, samt identitet och koncentration för eventuella lösningsmedel som använts,

— om ämnet är radioaktivt märkt ska de märkta atomernas exakta position, den specifika radioaktiviteten och andelen radioaktivitet kopplad till föroreningar anges.

Testarter

— vetenskapligt namn, stam, källa, eventuell förbehandling, acklimatisering, ålder, storleksintervall osv.

Testbetingelser

— tillämpat testförfarande (t.ex. statiskt, semistatiskt eller genomflöde),

— belysningens typ och egenskaper samt ljusperiod(er),

— testutformning (t.ex. provningsbehållarnas antal, material och storlek, vattenvolymen, sedimentets vikt och volym, vattenväxlingshastigheten (för genomflödestest eller semistatiskt förfarande), all luftning som används före och under testet, antalet replikat, antalet maskar per replikat, antalet testkoncentrationer, upptagnings- och elimineringsfasernas varaktighet samt provtagningsfrekvens),

▼M6

— metod för beredning och applicering av testämnet samt motivering av valet av en specifik metod,

— de nominella testkoncentrationerna,

— källa för beståndsdelarna i det syntetiska vattnet och sedimentet eller – om ett naturligt medium används – vattnets och sedimentets härkomst, beskrivning av eventuell förbehandling, resultat från eventuella demonstrationer av försöksdjurens förmåga att leva och/eller fortplanta sig i de medier som används, sedimentegenskaper (pH och ammoniak i porvattnet (naturliga sediment), halt av organiskt kol (TOC), partikelstorleksfördelning (procent sand, silt och lera), procentuell andel vatten, och eventuella andra gjorda mätningar) och vattnets egenskaper (pH, hårdhet, konduktivitet, temperatur, halten löst syre, restklornivåer (om de har uppmätts), och eventuella andra gjorda mätningar),

— den nominella och uppmätta torrvikten i procent av våtvikten (eller förhållandet mellan torrvikt och våtvikt) för syntetiskt sediment, den uppmätta torrvikten i procent av våtvikten (eller förhållandet mellan torrvikt och våtvikt) för fältsediment,

— vattenkvaliteten i testkärlen beskriven med uppgifter om temperatur, pH, ammonium, total hårdhet och halten löst syre,

— detaljerad information om behandlingen av vatten-, sediment- och maskprover, inbegripet detaljer om beredningen, lagringen, spikningsförfaranden, extraktionsmetoder och analysförfaranden samt deras noggrannhet för testämnet och fettinnehållet, och utbyte för testämnet.

Resultat

— dödligheten för kontrollmaskarna och maskarna i varje testbehållare, samt eventuella observerade subletala effekter inklusive onormalt beteende (t.ex. undvikande av sedimentet, närvaro eller frånvaro av fekala pelletar, avsaknad av fortplantning),

— den uppmätta torrvikten i procent av våtvikten (eller förhållandet mellan torrvikt och våtvikt) för sedimentet och testorganismerna (används vid normaliseringen),

— fettinnehållet i maskarna,

— kurvor som visar upptagnings- och elimineringskinetiken för testämnet i maskarna, och den tid det tar för att uppnå ett stabilt tillstånd,

— C_a, C_s och C_w (med standardavvikelse och intervall, om tillämpligt) för samtliga provtagningstillfällen (C_a uttryckt som g kg^{-1} våt- och torrvikt för hela kroppen, C_s uttryckt som g kg^{-1} våt- och torrvikt för sedimentet, och C_w i mg l^{-1}). Om det krävs en ackumuleringsfaktor för biota/sediment (BSAF, se bilaga 1 för en definition), t.ex. för jämförelse av resultaten från två eller flera tester som utförts med djur som har olika fettinnehåll, kan C_a även uttryckas som g kg^{-1} fettinnehåll i organismen, och C_s kan uttryckas som g kg^{-1} organiskt kol (OC) i sedimentet.

— BAF (uttryckt i kg vått sediment kg^{-1} våt mask), sedimentets upptagningskonstant k_s (uttryckt i g vått sediment kg^{-1} våt mask d^{-1}), och elimineringskonstanten k_e (uttryckt i d^{-1}). BSAF (uttryckt i kg sediment OC kg^{-1} maskarnas fettinnehåll) kan dessutom rapporteras,

▼M6

— icke-eliminerade rester (NER) i slutet av elimineringsfasen,

— om de har uppmätts: de procentsatser av det ursprungliga ämnet, nedbrytningsprodukterna och de bundna resterna (dvs. den procentandel testämne som inte kan extraheras med vanliga extraktionsmetoder) som påvisas i försöksdjuren,

— metoder som använts för statistiska analyser av data.

Utvärdering av resultaten

— resultatens överensstämmelse med giltighetskriterierna som förtecknas i punkt 21,

— oförväntade eller ovanliga resultat, t.ex. ofullständig eliminering av testämnet från försöksdjuren. I sådana fall kan resultaten från eventuella preliminära studier tillhandahålla användbar information.

▼M6

Tillägg 1

Definitioner och enheter

Syntetiskt sediment eller rekonstituerat eller konstgjort sediment: en blandning av material som är avsedda att efterlikna de fysiska beståndsdelarna i naturligt sediment.

Bioackumulering: ökningen av testämnets koncentration i eller på en organism i förhållande till testämnets koncentration i det omgivande mediet. Bioackumulering uppstår till följd av både biokoncentrations- och biomagnifieringsprocesser (se nedan).

Bioackumuleringsfaktorn (BAF): den koncentration av testämnet under valfri tidpunkt under upptagningsfasen som förekommer i eller på testorganismen (Ca uttryckt som g kg^{-1} torr- eller våtvikt) dividerad med testämnets koncentration i det omgivande mediet (C_s uttryckt som g kg^{-1} torr- eller våtvikt sediment). För att hänvisa till enheterna för C_a och C_s har BAF-värdet enheten kg sediment kg^{-1} mask (15).

Bioackumuleringsfaktorer som beräknas direkt utifrån kvoten av sedimentets upptagningskonstant dividerad med konstanterna för elimineringshastighet (k_s respektive k_e, se nedan) kallas kinetiska bioackumuleringsfaktorer (BAF_K).

Biokoncentration: ökningen i testämnets koncentration i eller på en organism uteslutande till följd av upptagning via kroppsytan, i förhållande till testämnets koncentration i det omgivande mediet.

Biomagnifiering: ökningen i testämnets koncentration i eller på en organism, främst till följd av upptagning från förorenad föda eller förorenat byte, i förhållande till testämnets koncentration i födan eller bytet. Biomagnifiering kan leda till överföring eller ackumulering av testämnet inom näringskedjor.

Ackumuleringsfaktorn biota/sediment (BSAF): den fettnormaliserade testämneskoncentrationen vid ett stabilt tillstånd i eller på testorganismen dividerad med den organiskt kol-normaliserade koncentrationen av ämnet i sedimentet vid ett stabilt tillstånd. C_a uttrycks då som g kg^{-1} fettinnehåll i organismen och C_s som g kg^{-1} organiskt innehåll i sedimentet.

Konditioneringsperioden: används för att stabilisera den mikrobiella komponenten i sedimentet och avlägsna t.ex. ammoniak från sedimentets beståndsdelar. Den äger rum före spikningen av sedimentet med testämnet. Vanligtvis kastas det överliggande vattnet bort efter konditioneringen.

Eliminering av ett testämne: förlusten av detta ämne från testorganismens vävnad genom aktiva eller passiva processer som inträffar oberoende av förekomsten eller frånvaron av testämnet i det omgivande mediet.

Elimineringsfas: den tid efter överföringen av testorganismerna från ett förorenat medium till ett medium som inte innehåller testämne under vilken elimineringen (eller nettoförlusten) av ämnet från testorganismerna studeras.

Elimineringskonstant (k_e): det numeriska värde som definierar reduktionshastigheten för testämneskoncentrationen i eller på testorganismen efter överföring av testorganismerna från ett medium som innehåller testämnet till ett kemikaliefritt medium (k_e uttrycks i d^{-1}).

▼M6

Stabiliseringsperiod: används för att låta testämnet fördela sig mellan den fasta fasen, porvattnet och det överliggande vattnet. Den äger rum efter spikningen av sedimentet med testämnet och före tillsatsen av testorganismerna.

Fördelningskoefficienten oktanol/vatten (K_{ow}): förhållandet mellan ämnets löslighet i n-oktanol och i vatten vid jämvikt, ibland även uttryckt som P_{ow}. Logaritmen av K_{ow} (log K_{ow}) används som en indikation på ett ämnes potential för bioackumulering i vattenlevande organismer.

Fördelningskoefficienten organiskt kol/vatten (K_{oc}): förhållandet mellan ett ämnes koncentration i eller på sedimentets fraktion av organiskt kol och ämnets koncentration i vatten vid jämvikt.

Överliggande vatten: det vatten som täcker sedimentet i testkärlet.

Platå eller **stabilt tillstånd**: ett tillstånd där jämvikt råder mellan de upptagnings- och elimineringsprocesser som inträffar samtidigt under exponeringsfasen. Det stabila tillståndet uppnås i diagrammet över BAF vid varje provtagningsperiod mot tiden när kurvan blir parallell med tidsaxeln och tre på varandra följande analyser av BAF på prover tagna med intervaller på minst två dagar ligger inom 20 % av varandra, och det inte finns några statistiskt signifikanta skillnader mellan de tre provtagningsperioderna. För testämnen som tas upp långsamt är det lämpligare med intervall på sju dagar (5).

Porvatten: det vatten som finns i mellanrummen mellan sediment- eller jordpartiklar.

Konstanten för sedimentets upptagningshastighet (k_s): ett numeriskt värde som definierar ökningshastigheten av testämneskoncentrationen i eller på testorganismen till följd av upptagning från sedimentfasen (k_s uttrycks som g sediment kg^{-1} maskar d^{-1}).

Spikat sediment: sediment till vilket ett testämne har tillsatts.

Bioackumuleringsfaktor vid stabilt tillstånd (BAF_{ss}): den BAF som gäller vid ett stabilt tillstånd och som inte förändras betydligt över en längre tidsperiod, förutsatt att testämneskoncentrationen i det omgivande mediet (C_s uttryckt som g kg^{-1} våt- eller torrvikt sediment) är konstant under denna tidsperiod.

Upptagnings- eller exponeringsfasen: den tid under vilken testorganismerna exponeras för testämnet.

▼M6

Tillägg 2

Beräkning av upptagnings- och elimineringsparametrar

Den viktigaste endpointen i ett bioackumuleringstest är bioackumuleringsfaktorn, BAF. Det uppmätta BAF-värdet kan beräknas genom att dividera testämneskoncentrationen i testorganismen, C_a, med testämneskoncentrationen i sedimentet, C_s, vid stabilt tillstånd. Om ett stabilt tillstånd inte uppnås under upptagningsfasen beräknas BAF på samma sätt för dag 28. Man bör dock notera huruvida BAF är baserat på koncentrationer vid stabilt tillstånd eller inte.

Den bästa metoden för att få fram den kinetiska bioackumuleringsfaktorn (BAF_K), konstanten för upptagningshastigheten i sedimentet (k_s) och elimineringskonstanten (k_e) är att använda icke-linjära datorbaserade parameteruppskattningsmetoder. Förutsatt att man känner till tidsserien av genomsnittliga ackumuleringsfaktorer (C_a, medelvärden för varje provtagningsdatum/C_s, medelvärden för varje provtagningsdatum = AF) för upptagningsfasen på grundval av maskarnas och sedimentets våtvikt, och modellekvationen

$$AF(t) = BAF \times (1 - e^{ke \times t}) \qquad \text{[ekvation 1]}$$

där AF(t) är förhållandet mellan testämneskoncentrationen i maskarna och testämneskoncentrationen i sedimentet vid en given tidpunkt (t) i upptagningsfasen, kan dessa datorprogram beräkna värden för BAF_K, k_s och k_e.

Om ett stabilt tillstånd inte uppnås under upptagningsfasen, (dvs. $t = \infty$), kan ekvation 1 förenklas till

$$BAF_K = \frac{k_s}{k_e} \qquad \text{[ekvation 2]}$$

där

k_s = konstanten för upptagningshastigheten i vävnad (g sediment kg^{-1} maskar d^{-1})

k_e = elimineringskonstanten (d^{-1})

Då är $k_s/k_e \times C_s$ en tillnärmning av testämneskoncentrationen i maskvävnad vid ett stabilt tillstånd ($C_{a,ss}$).

Ackumuleringsfaktorn biota/sediment (BSAF) beräknas på följande sätt:

$$BSAF = BAF_K \times \frac{f_{oc}}{f_{lip}}$$

där f_{oc} är fraktionen organiskt kol i sedimentet och f_{lip} är fraktionen fett i maskarna, båda baserade antingen på torrvikt eller på våtvikt.

Förutsatt att man känner till en tidsserie med koncentrationsvärden kan elimineringskinetiken modelleras med hjälp av följande modellekvationer och en icke-linjär datorbaserad parameteruppskattningsmetod.

Det genomsnittliga uppmätta värdet för rester i kroppen vid slutet av upptagningsfasen rekommenderas som standardutgångspunkt. Värdet som modellerats/beräknats från upptagningsfasen bör endast användas t.ex. om det uppmätta värdet avviker väsentligt från det modellerade värdet för rester i kroppen. Se även punkt 50 för alternativa förhandsexponeringar av de maskar som valts ut för elimineringen. Med detta tillvägagångssätt anses proverna från dessa förhandsexponerade maskar på dag 0 av elimineringsfasen ge en realistisk mängd rester i kroppen att inleda elimineringskinetiken med.

▼M6

Om datapunkterna plottade mot tiden indikerar en konstant exponentiell minskning av testämneskoncentrationen i djuren kan en one-compartment-modell (ekvation 4) användas för att beskriva elimineringens tidsförlopp.

$$C_a(t) = C_{a,ss} \times e^{-k_e t} \qquad \text{[ekvation 3]}$$

Elimineringsprocesserna verkar ibland ha två faser med en snabb minskning av C_a till en början och därefter en långsammare avgång av testämnen senare under elimineringen (8) (19) (25)). De två faserna kan tolkas med antagandet att det finns två olika avdelningar (compartments) i organismen från vilka testämnet avgår med olika hastighet. I sådana fall bör information inhämtas från specifik litteratur (15) (16) (17) (25).

En two-compartment-eliminering beskrivs t.ex. genom följande ekvation (25):

$$C_a = A \times e^{-k_a \times t} + B \times e^{k_b \times t} \qquad \text{[ekvation 4]}$$

A och B utgör storleken på avdelningarna (i procent av de totala resterna i vävnaderna), där A är avdelningen med snabb förlust av ämnet och B avdelningen med långsam förlust av testämnet. Summan av A och B motsvarar 100 % av hela djurets avdelningsvolym vid ett stabilt tillstånd. k_a och k_b representerar motsvarande elimineringskonstanter (d^{-1}). Om two-compartmentmodellen anpassas till depureringsdata kan upptagningskonstanten k_s bestämmas på följande sätt (53) (54):

$$k_s = \frac{(A \times k_a + B \times k_b) \times BAF}{A + B} \qquad \text{[ekvation 5]}$$

Dessa modellekvationer bör dock användas med försiktighet, särskilt när förändringar i testämnets biotillgänglighet inträffar under testets gång (42).

Som ett alternativ till de ovan beskrivna modellekvationerna kan kinetiken (k_s och k_e) även beräknas i ett steg genom att tillämpa modellen för första ordningens kinetik på alla data från både upptagnings- och elimineringsfasen tillsammans. För en beskrivning av en metod som möjliggör en sådan kombinerad beräkning av upptagnings- och elimineringskonstanterna, se hänvisningarna (55), (56) och (57).

De icke-eliminerade resterna (NER) bör beräknas som en sekundär endpoint genom att multiplicera förhållandet mellan den genomsnittliga koncentrationen i maskarna (C_a) på dag 10 av elimineringsfasen och den genomsnittliga koncentrationen i maskarna (C_a) vid ett stabilt tillstånd (dag 28 i upptagningsfasen) med 100:

$$\boldsymbol{NER_{10d}[\%] = \frac{C_a \textit{vid elimineringens slut}(\textit{genomsnitt}) \times 100}{C_a \textit{vid stabilt tillstånd}(\textit{genomsnitt})}}$$

▼M6

Tillägg 3

Exempel på provtagningsschema för ett 28-dagars bioackumuleringstest

a) **Upptagningsfas (inbegripet en fyra dagars stabiliseringsfas)**

Dag	Aktiviteter
– 6	Bered torvlösningen för sedimentet, konditionera lösningen i 48 timmar.
– 4	Spika sedimentet eller sedimentfraktionen, blanda alla beståndsdelar till sedimentet, ta sedimentprover på behandlat kontrollsediment och kontrollsediment med lösningsmedel för bestämning av testämneskoncentrationen, tillsätt det överliggande vattnet, inkubera under testförhållanden (stabiliseringsfasen).
– 3/– 2	Skilj testorganismerna från odlingen för acklimatisering.
0	Mät vattenkvaliteten (se punkt 52), avlägsna replikat för provtagning av vatten och sediment för bestämning av testämneskoncentrationer, fördela maskarna slumpmässigt i testbehållarna, behåll tillräcklig mängd delprov med maskar för bestämning av de analytiska bakgrundsvärdena, kontrollera lufttillförseln vid användning av ett slutet testsystem.
1	Avlägsna replikat för provtagning, kontrollera lufttillförseln, maskarnas beteende, vattenkvaliteten (se punkt 56), ta vatten-, sediment- och maskprover för bestämning av testämneskoncentrationen.
2	Kontrollera lufttillförseln, maskarnas beteende och temperaturen.
3	Samma som dag 1.
4–6	Samma som dag 2.
7	Samma som dag 1, fyll på vatten vid behov för att kompensera för avdunstat vatten.
8–13	Samma som dag 2.
14	Samma som dag 1, fyll på vatten vid behov för att kompensera för avdunstat vatten.
15–20	Samma som dag 2.
21	Samma som dag 1, fyll på vatten vid behov för att kompensera för avdunstat vatten.
22–27	Samma som dag 2.
28	Samma som dag 1, mät vattenkvaliteten (se punkt 52), slutet på upptagningsfasen, behåll tillräcklig mängd delprov med maskar för bestämning av de analytiska bakgrundsvärdena, våt- och torrvikt samt fettinnehåll, överför maskarna från de kvarvarande exponeringskärlen till kärl som innehåller rent sediment för elimineringsfasen (ingen tarmtömning), ta vatten-, sediment- och maskprover på lösningsmedelskontrollerna, ta prover på lösningarna i fällorna, om sådana används.
	Förhandsexponeringsaktiviteterna (stabiliseringsfasen) bör planeras med hänsyn tagen till egenskaperna hos det ämne som testas. Om så krävs, konditionera det beredda sedimentet under överliggande vatten vid 20 ± 2 °C i sju dagar – bered i så fall sedimentet tidigare!
	Aktiviteterna för dag 2 bör genomföras dagligen (åtminstone på arbetsdagar).

▼**M6**

b) **Elimineringsfas**

Dag	Aktiviteter
– 6	Bered torvlösningen för sedimentet, konditionera lösningen i 48 timmar.
– 4	Blanda alla beståndsdelar till sedimentet, ta sedimentprover på behandlat kontrollsediment och kontrollsediment med lösningsmedel för bestämning av testämneskoncentrationen, tillsätt det överliggande vattnet, inkubera under testförhållanden.
0 (dag 28 i upp-tagnings-fasen)	Mät vattenkvaliteten (se punkt 52), överför maskarna från de återstående exponeringsreplikatkärlen till kärl som innehåller rent sediment, avlägsna replikaten efter **4–6 timmar** för provtagning av vatten, sediment och maskar för bestämning av testämneskoncentrationen, fördela maskarna slumpvis i test-behållarna.
1	Avlägsna replikat för provtagning, kontrollera lufttillförseln, maskarnas beteende, vattenkvaliteten (se punkt 52), ta vatten-, sediment- och maskprover för bestämning av testämneskoncentrationen.
2	Kontrollera lufttillförseln, maskarnas beteende och temperaturen.
3	Samma som dag 1.
4	Samma som dag 2.
5	Samma som dag 1.
6	Samma som dag 2.
7	Samma som dag 1, fyll på vatten vid behov för att kompensera för avdunstat vatten.
8–9	Samma som dag 2.
10	Samma som dag 1, slutet på elimineringsfasen, mät vattenkvaliteten (se punkt 52), ta vatten-, sediment- och maskprover på lösningsmedelskontrollerna, ta prover på lösningarna i fällorna, om sådana används.
	Beredningen av sedimentet före elimineringsfasens början bör göras på samma sätt som före upp-tagningsfasens början.
	Aktiviteterna för dag 2 bör genomföras dagligen (åtminstone på arbetsdagar).

▼**M6**

Tillägg 4

Vissa fysikalisk-kemiska egenskaper hos godtagbart utspädningsvatten

BESTÅNDSDEL	KONCENTRATIONER
Partiklar	< 20 mg/l
Halt av organiskt kol	< 2µg/l
Ojoniserad ammoniak	< 1 µg/l
Resterande mängd klor	< 10 µg/l
Total mängd bekämpningsmedel som innehåller organiska fosforföreningar	< 50 ng/l
Total mängd bekämpningsmedel som innehåller organiska klorföreningar plus polyklorerade bifenyler	< 50 ng/l
Total mängd organiskt klor	< 25 ng/l

DET REKOMMENDERADE REKONSTITUERADE VATTNETS SAMMANSÄTTNING

(a) Kalciumkloridlösning

Lös upp 11,76 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ i avjonat vatten och späd till 1 liter med avjonat vatten

(b) Magnesiumsulfatlösning

Lös upp 4,93 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ i avjonat vatten och späd till 1 liter med avjonat vatten

(c) Natriumbikarbonatlösning

Lös upp 2,59 g $NaHCO_3$ i avjonat vatten och späd till 1 liter med avjonat vatten

(d) Kaliumkloridlösning

Lös upp 0,23 g KCl i avjonat vatten och späd till 1 liter med avjonat vatten

Alla kemikalier ska vara av analyskvalitet.

Konduktiviteten i det destillerade eller avjonade vattnet bör inte överstiga 10 μScm^{-1}.

25 ml av var och en av lösningarna (a) till (d) blandas och den totala volymen späds till 1 liter med avjonat vatten. Summan av kalcium- och magnesiumjoner i denna lösning är 2,5 mmol/l.

Förhållandet mellan Ca- och Mg-joner är 4:1 och mellan Na- och K-joner 10:1. Syrakapaciteten $K_{S4,3}$ i denna lösning är 0,8 mmol/l.

Lufta utspädningsvattnet till dess att syremättnad uppnås, och lagra det sedan i ungefär två dagar utan ytterligare luftning före användning.

pH-värdet för godtagbart utspädningsvatten bör ligga i intervallet 6–9.

▼M6

Tillägg 5

Syntetiskt sediment – rekommendationer om beredning och lagring

I motsats till kraven i testmetod C.8 (40) rekommenderas att torvinnehållet i det syntetiska sedimentet ska vara 2 % i stället för 10 % torrsubstans, för att motsvara en låg till måttlig halt av organiska ämnen i naturliga sediment (58).

Den procentuella andelen torra beståndsdelar i det syntetiska sedimentet:

Beståndsdel	Egenskaper	% av torrt sediment
Torv	Vitmosstorv (*Sphagnum*), nedbrytningsgrad: ”medium”, lufttorkad, inga synliga växtrester, finfördelad (partikelstorlek ≤ 0,5 mm)	2 ± 0,5
Kvartssand	Kornstorlek: ≤ 2 mm, men > 50 % av partiklarna bör vara av storleken 50–200 μm	76
Kaolinlera	Kaolinithalt ≥ 30 %	22 ± 1
Foderkälla	*Folia urticae*, pulvriserade blad av *Urtica* sp. (nässla), finmalda (partikelstorlek ≤ 0,5 mm), eller en blandning av pulvriserade blad från *Urtica* sp. med alfacellulosa (1: 1), i enlighet med apoteksstandarder, lämplig som livsmedel, dessutom torrt sediment	0,4–0,5 %
Kalcium-karbonat	$CaCO_3$, i pulverform, kemiskt rent, dessutom torrt sediment	0,05–1
Avjonat vatten	Konduktivitet ≤ 10 μS/cm, utöver torrt sediment	30–50

Om man förväntar sig förhöjda koncentrationer av ammoniak, t.ex. om det är känt att testämnet hämmar nitrifikationen, kan det vara lämpligt att ersätta 50 % av det kväverika nässlelpulvret med cellulosa (t.ex. alfacellulosapulver, kemiskt rent, partikelstorlek ≤ 0,5 mm).

Beredning

Torven lufttorkas och mals ner till ett fint pulver (kornstorlek ≤ 0,5 mm, inga synliga växtrester). En suspension med den erforderliga mängden torvpulver bereds med en del av det avjonade vatten som ska tillsättas det torra sedimentet (en vattenvolym på 11,5 × torrvikt torv har visat sig användbar för att producera en rörbar torvsörja (8)) med hjälp av en högpresterande homogeniseringsapparat.

Suspensionens pH justeras till 5,5 ± 0,5 med $CaCO_3$. Suspensionen konditioneras i minst två dagar med skonsam omrörning vid 20 ± 2 °C, för att stabilisera pH-värdet och skapa en stabil mikrobiell komponent. pH uppmäts på nytt och justeras vid behov till 6,0 ± 0,5 med $CaCO_3$. Sedan blandas hela suspensionen med övriga torra beståndsdelar, med hänsyn tagen till de delar som används för spikning. Det återstående avjonade vattnet tillsätts för att erhålla ett homogent sediment. pH uppmäts på nytt och justeras vid behov till 6,5–7,5 med $CaCO_3$. Om man förväntar sig utveckling av ammoniak kan det vara lämpligt att hålla pH-värdet i sedimentet under 7,0 (t.ex. mellan 6,0 och 6,5). Prover tas av sedimentet för att bestämma torrvikten och halten av organiskt kol. Om man förväntar sig utveckling av ammoniak, kan det syntetiska sedimentet konditioneras i sju dagar under samma betingelser som råder i det efterföljande testet (t.ex. ett förhållande mellan sediment och vatten på 1: 4, sedimentskiktets tjocklek som i testkärlen) innan det spikas med testämnet, dvs. det bör fyllas på med vatten, som bör luftas. I slutet av konditioneringsperioden bör det överliggande vattnet avlägsnas och kasseras. Prover tas av sedimentet för att bestämma torrvikten och halten av organiskt kol (t.ex. tre prov).

▼M6

Därefter blandas den spikade kvartssanden med sedimentet för varje behandlingsnivå, och sedimentet fördelas till replikattestkärlen, som fylls på med testvatten (t.ex. förhållande mellan sediment och vatten 1:4, sedimentskiktets tjocklek samma som i testkärlen). Kärlen inkuberas sedan under samma betingelser som råder i det efterföljande testet. Det är nu stabiliseringsperioden inleds. Det överliggande vattnet bör luftas.

Den valda foderkällan bör läggas till före eller under spikningen av sedimentet med testämnet. Inledningsvis kan den blandas med torvsuspensionen (se ovan). Man kan dock undvika onödig försämring av foderkällan före tillsatsen av testorganismerna – t.ex. vid långa stabiliseringsperioder – genom att man påbörjar exponeringen så snart som möjligt efter fodertillsatsen. För att se till att fodret är i tillräcklig kontakt med testämnet bör foderkällan blandas med sedimentet senast samma dag som sedimentet spikas med testämnet. Undantag kan göras om stabiliseringsperiodens längd leder till en alltför stor mikrobiell nedbrytning av fodret innan testorganismerna tillförs. Prover tas av sedimentet för att bestämma torrvikten och halten av organiskt kol (t.ex. tre prover av det spikade sedimentet eller kontrollsedimentet).

Komponenternas (torv, sand, kaolin) torrvikt ska rapporteras i gram och i procent av den totala torrvikten.

Den volym vatten som ska tillsättas till de torra beståndsdelarna under beredningen av sedimentet bör också rapporteras i procent av den totala torrvikten (t.ex. 100 % torrvikt + 46 % vatten betyder att till 1 000 g torrvikt tillsätts sammanlagt 460 ml vatten, vilket ger 1 460 g vått sediment).

Lagring

Det syntetiska sedimentets torra beståndsdelar kan lagras i ett torrt och svalt utrymme vid rumstemperatur. Det färdigberedda våta sedimentet kan lagras (endast för fortsatt användning i kulturen) vid 4 ± 2 °C i mörker under en period på 2–4 veckor från beredningsdagen (8).

Sediment som spikats med testämne bör användas omedelbart, med undantag för om det finns information om att sedimentet i fråga kan förvaras utan att testämnets toxicitet och biotillgänglighet påverkas. Prover av spikat sediment kan lagras under de förhållanden som rekommenderas för testämnet i fråga fram till analysen.

▼M6

Tillägg 6

Arter av oligochaeta som rekommenderas för bioackumuleringstester

***Tubifex tubifex* (MÜLLER), Tubificidae, Oligochaeta**

Glattmasken *Tubifex tubifex* (Müller) (Tubificidae, Oligochaeta) lever i sötvattenssediment i rör som är fodrade med slem. Maskarna lever i dessa rör med huvudet nedåt och äter sedimentpartiklar från vilka de tillgodogör sig mikroorganismer och organiskt material. Bakdelen tjänar som andningsorgan och vajar normalt sett i det överliggande vattnet. Även om denna art lever i ett stort antal sedimenttyper över hela norra halvklotet, föredrar *Tubifex tubifex* relativt små kornstorlekar (59). Denna arts lämplighet för ekotoxikologisk testning beskrivs exempelvis i (8) (29) (31) (39) (60) (62) (63).

Odlingsmetoder

För att man ska få ett tillräckligt antal *Tubifex tubifex* för bioackumuleringstester måste maskarna hållas i en permanent laboratorieodling. Ett system som består av syntetiskt sediment baserat på syntetisk jord i enlighet med testmetod C.8 (40) och rekonstituerat vatten i enlighet med testmetod C.1 rekommenderas för odling av *T. tubifex* (8).

Behållare av glas eller rostfritt stål med en höjd på 12–20 cm kan användas som odlingskärl. Varje odlingsbehållare fylls med ett skikt fuktigt syntetiskt sediment som beretts enligt anvisningarna i tillägg 5. Sedimentskiktets djup bör vara lämpligt för maskarnas naturliga grävbeteende (minst 2 cm djup för *T. tubifex*). Rekonstituerat vatten tillsätts till systemet. Man bör undvika att störa sedimentet. Vattnet ska luftas försiktigt (t.ex. 2 bubblor per sekund med 0,45 µm-filtrerad luft) via en pasteurpipett placerad 2 cm ovanför sedimentets yta. Den rekommenderade odlingstemperaturen är 20 ± 2 °C.

Maskarna tillförs till odlingssystemet med en högsta djurtäthet på 20 000 individer/m^2 sedimentyta. En större djurtäthet kan leda till minskad tillväxt och fortplantning (43).

I odlingar med syntetiskt sediment måste maskarna utfodras. Foder bestående av finmalt fiskfoder, t.ex. TetraMin®, kan tjäna som tilläggsnäring (8); Klerks 1994, pers. medd. Utfodringsfrekvensen bör möjliggöra tillräcklig tillväxt och fortplantning och minimera ackumuleringen av ammoniak och svamptillväxt i odlingen. Utfodring bör ske två gånger per vecka (t.ex. 0,6–0,8 mg per cm^2 sedimentyta). Praktiska erfarenheter har visat att applicering av foder som suspenderats och homogeniserats i avjonat vatten kan underlätta en homogen foderdistribution på sedimentytan i odlingsbehållarna.

För att undvika ackumulering av ammoniak bör det överliggande vattnet bytas ut via ett genomflödessystem, eller manuellt åtminstone en gång i veckan. Sedimentet bör bytas ut var tredje månad i stamodlingarna.

Provtagning av maskar från odlingen kan göras genom att sikta odlingssedimentet genom en 1 mm sikt om man endast behöver vuxna djur. För insamling av kokonger behövs en 0,5 mm sikt, och för juvenila maskar en 0,25 mm sikt. Siktarna kan placeras i rekonstituerat vatten efter det att sedimentet har passerat igenom dem. Maskarna lämnar nätet och kan därefter plockas upp ur vattnet med hjälp av en mjuk stålpincett eller en pipett med flampolerade kanter.

▼M6

Endast intakta och tydligt identifierade exemplar av *Tubifex tubifex* (t.ex. (64)) används för att inleda ett test eller starta nya odlingar. Sjuka eller skadade maskar samt kokonger angripna av svamphyfer måste kastas bort.

En synkroniserad odling kan tillhandahålla maskar med specificerad ålder i lämpliga intervall när så önskas. Vid de valda intervallen (t.ex. varannan vecka) startas nya odlingar i separata kärl med djur i en viss ålder (t.ex. kokonger). Vid de odlingsbetingelser som beskrivs här når maskarna vuxen ålder efter 8–10 veckor. Odlingarna kan skördas när maskarna har producerat nya kokonger, t.ex. efter tio veckor. De insamlade vuxna djuren kan användas för tester, och nya kulturer kan startas med kokongerna.

***Lumbriculus variegatus* (MÜLLER), Lumbriculidae, Oligochaeta**

Lumbriculus variegatus (Lumbriculidae, Oligochaeta) lever också i sötvattenssediment över hela världen och används allmänt för ekotoxikologisk testning. Information om arternas biologi, odlingsförhållanden och känslighet finns i (1) (6) (9) (36). *Lumbriculus variegatus* kan med vissa begränsningar också odlas i det syntetiska sediment som rekommenderas för *T. tubifex* enligt (8). Eftersom *L. variegatus* i naturen föredrar grövre sediment än *T. tubifex* (59) kan laboratorieodlingar med det syntetiska sediment som används för *T. tubifex* upphöra efter 4–6 månader. Praktiska erfarenheter visar att *L. variegatus* kan hållas i ett sandigt substrat (t.ex. kvartssand, fint grus) i ett genomflödessystem med fiskfoder som näringskälla under flera år utan att man behöver förnya substratet. En stor fördel med *L. variegatus* framför andra vattenlevande oligochaeter är dess snabba fortplantning, vilket leder till en snabbt ökande biomassa i laboratorieodlade populationer (1) (6) (9) (10).

Odlingsmetoder

Odlingsbetingelser för *Lumbriculus variegatus* beskrivs i detalj i Phipps m.fl. (1993) (10), Brunson m.fl. (1998) (28), ASTM (2000) (1), U.S. EPA (2000) (6). En kort sammanfattning av dessa betingelser ges nedan.

Maskarna kan odlas i stora akvarier (57–80 liter) vid 23 °C med fotoperiod på 16 timmar ljus (100–1 000 lux) och 8 timmar mörker med dagligen förnyat naturligt vatten (45–50 liter per akvarium). Substratet bereds genom att oblekta bruna pappersservetter klipps till remsor, som sedan blandas med odlingsvatten i några sekunder, vilket leder till att man får små bitar av papperssubstrat. Detta substrat kan sedan omedelbart användas i odlingsakvarier för *Lumbriculus* genom att man täcker botten av akvariet med det, eller lagras fryst i avjonat vatten för senare användning. Nytt substrat i akvariet räcker i allmänhet i ungefär två månader.

Varje maskodling startas upp med 500–1 000 maskar som utfodras med en 10 ml suspension innehållande 6 g yngelfoder för öring tre gånger per vecka under förnyelse- eller genomflödesförhållanden. Statiska eller semistatiska odlingar bör ha lägre utfodringsfrekvens för att förebygga tillväxt av bakterier och svamp. Foder och papperssubstrat bör analyseras med avseende på de ämnen som ska användas i bioackumuleringstesterna.

Under dessa förhållanden fördubblas vanligen antalet individer i odlingen på cirka 10–14 dagar.

Lumbriculus variegatus kan avlägsnas från odlingarna t.ex. genom att substratet överförs med ett finmaskigt nät, eller med hjälp av en glaspipett med bred spets (cirka 5 mm i diameter), till en separat bägare. Om man också överför substrat till denna bägare låter man bägaren som innehåller maskar och substrat stå över natten under genomflödesförhållanden, vilket gör att substratet avlägsnas från

▼M6

bägaren medan maskarna blir kvar på kärlets botten. De kan sedan överföras till nyligen beredda odlingsakvarier eller bearbetas ytterligare för testet enligt beskrivning i (1) och (6). Skador eller autotomi bör undvikas, t.ex. genom att man använder pipetter med flampolerade kanter eller tandläkarsonder av rostfritt stål vid hanteringen av maskarna.

En fråga som man bör kritiskt beakta vid användning av *L. variegatus* i bioackumuleringstest med sediment är dess reproduktionssätt (fragmentering (architomy) följt av regenerering (morphallaxis)). Resultatet av denna asexuella reproduktion är två delar som inte intar någon föda förrän den främre eller bakre delen regenererats (t.ex. (36)(37)). Detta innebär när det gäller *L. variegatus* att upptagningen av sediment och föroreningar genom födan eventuellt inte sker löpande som hos glattmaskar (Tubificidae), vilka inte fortplantar sig genom delning.

Därför bör en synkronisering utföras för att minimera okontrollerad reproduktion och regenerering, som båda leder till stora variationer i testresultaten. Denna variation kan inträffa om vissa individer, som har genomgått delning och därmed inte intar någon föda under en viss tid, i mindre grad exponeras för testkemikalien än andra individer som inte genomgår delning under testet, t.ex. (38). Maskarna bör delas på konstgjord väg 10–14 dagar före början av exponeringen (synkronisering) (65). Stora maskar bör användas som helst inte visar några tecken på att nyligen ha delats. Dessa maskar kan placeras på ett objektglas med en droppe odlingsvatten och skäras av på den mittersta kroppsregionen med en skalpell. Man bör se till att de bakre ändarna är av liknande storlek. Man bör sedan låta de bakre ändarna återbilda nya huvuden i ett kulturkärl som innehåller samma substrat som används i kulturen och rekonstituerat vatten tills exponeringen inleds. Tecknet på att regenereringen av nya främre delar pågår är att de synkroniserade maskarna gräver sig igenom i substratet (närvaron av återbildade huvuddelar kan bekräftas genom att ett representativt delprov granskas i ett binokulärt mikroskop). Testorganismerna kan därefter förväntas befinna sig i ett liknande fysiologiskt tillstånd. Detta innebär att när de synkroniserade maskarna regenererar genom morphallaxis under testets gång exponeras praktiskt taget alla djur i lika hög grad för det spikade sedimentet. De synkroniserade maskarna bör utfodras så snart de börjar gräva sig genom substratet, eller sju dagar efter delningen. Utfodringen bör vara jämförbar med den i de vanliga odlingarna, men det är tillrådligt att ge de synkroniserade maskarna samma foder som ska användas i testet. Maskarna bör hållas i samma temperatur som i testet, dvs. 20 ± 2 °C. Efter regenerering bör intakta hela maskar av liknande storlek som aktivt simmar eller kryper efter lätt mekanisk retning användas för testet. Skador eller autotomi bör undvikas, t.ex. genom att man använder pipetter med flampolerade kanter eller tandläkarsonder av rostfritt stål vid hanteringen av maskarna.

Vid användning av *Lumbriculus variegatus* i testet bör en ökning av antalet maskar ske under testet på grund av artens specifika fortplantningssätt, om betingelserna är lämpliga (6). Avsaknad av fortplantning i bioackumuleringstest med *L. variegatus* bör registreras och beaktas vid tolkningen av testresultaten.

***Branchiura sowerbyi* (BEDDARD), Tubificidae, Oligochaeta (ej validerad i ringtestet)**

Branchiura sowerbyi lever i en mängd olika sedimenttyper i vattenmagasin, sjöar, dammar och floder, ursprungligen i tropiska områden. De finns också i varma vattenmassor på norra halvklotet. De är emellertid mer vanligt förekommande i gyttje-lersediment med hög halt av organiskt material. Maskarna lever i sedimentskiktet. Även maskarnas bakre ände är vanligen nergrävd. Denna art kan lätt identifieras på grund av gältrådarna på dess bakre del. Vuxna djur kan nå en

▼M6

längd på 9–11 cm och en vikt på 40–50 mg. Maskarna har en hög reproduktionstakt och uppvisar populationsfördubblingstider på mindre än två veckor under samma temperatur- och utfodringsförhållanden som beskrivs nedan (Aston m.fl., 1982 (65)). *B. sowerbyi* har använts i både toxicitets- och bioackumuleringsstudier (Marchese & Brinkhurst, 1996 (31) respektive Roghair m.fl., 1996, (67)).

Odlingsmetoder

En sammanfattning av odlingsbetingelserna för *Branchiura sowerbyi* återges nedan (tillhandahållna av Mercedes R. Marchese, INALI, Argentina, och Carla J. Roghair, RIVM, Nederländerna).

Man behöver inte hålla sig till en enda teknik för odling av testorganismerna. Organismerna kan odlas i oförorenade naturliga sediment (31). Praktiska erfarenheter har visat att ett medium bestående av naturligt sediment och sand förbättrar maskarnas tillstånd jämfört med rent naturligt sediment (32) (67). Trelitersbägare som innehåller 1 500 ml sediment/vattenmedium bestående av 375 ml naturligt oförorenat sediment (ca 10 % halt av organiskt kol, ca 17 % partiklar ≤ 63 μm), 375 ml ren sand (M32) och 750 ml rekonstituerat eller avklorerat vattenledningsvatten kan användas för odlingen (31) (32) (67). Pappersservetter kan också användas som substrat i odlingarna, men populationstillväxten är då lägre än i naturligt sediment. I semistatiska system luftas vattenskiktet i bägaren långsamt, och det överliggande vattnet bör förnyas en gång per vecka.

Varje bägare innehåller till att börja med 25 unga maskar. Efter två månader plockas de stora maskarna ut från sedimentet med en pincett och placeras i en ny bägare med nyberett sediment/vattenmedium. Den gamla bägaren innehåller också kokonger och unga maskar. Upp till 400 unga maskar per bägare kan insamlas på detta sätt. Vuxna maskar kan användas för fortplantning under minst ett år.

Temperaturen i kulturerna ska hållas mellan 21–25 °C. Temperaturvariationerna bör hållas under ± 2 °C. Den tid som krävs för embryots utveckling från äggläggning till dess att de unga maskarna lämnar kokongerna är ungefär tre veckor vid 25 °C. Äggproduktionen per överlevande mask befanns för *B. sowerbyi* vara från 6,36 (31) till 11,2 (30) i gyttja vid 25 °C. Antalet ägg per kokong varierar mellan 1,8 till 2,8 (66) (69) eller upp till 8 (68).

Löst syre, vattnets hårdhet, temperatur och pH bör mätas varje vecka. Fiskfoder (t.ex. TetraMin®) kan läggas till ad libitum som suspension två eller tre gånger per vecka. Maskarna kan också ad lib-utfodras med tinad sallat.

En stor fördel med denna art är den höga individuella biomassan (upp till 40–50 mg våtvikt per individ). Därför kan denna art användas för testning av bioackumuleringen av icke-radioaktivmärkta testämnen. Den kan exponeras i de system som används för *T. tubifex* eller *L. variegatus* med en enda individ per replikat (11). I sådana fall bör dock antalet replikat ökas, såvida inte större testbehållare används (11). Även giltighetskriteriet avseende grävbeteendet behöver justeras för denna 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. Vol. 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.

(2) Europeiska kommissionen (EC) (2003). Tekniska riktlinjer till stöd för kommissionens direktiv 93/67/EEG om riskbedömning för nya anmälda ämnen, kommissionens förordning (EG) nr 1488/94 om riskbedömning för existerande ämnen samt Europaparlamentets och rådets direktiv 98/8/EG om utsläppande av biocidprodukter på marknaden, del I–IV. Byrån för Europeiska gemenskapernas officiella publikationer, Luxemburg.

(3) OECD (1992a). Report of the OECD workshop on effects assessment of chemicals in sediment. OECD Monographs No. 60. Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling (OECD), Paris.

(4) Ingersoll, C. G., Ankley, G. T., Benoit D. A., Brunson, E. L., Burton, G. A., Dwyer, F. J., Hoke, R. A., Landrum, P. F., Norberg-King, T. J. och Winger, P. V. (1996). 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 denna bilaga, Biokoncentration: Genomflödesprovning med fisk.

(6) U.S. EPA (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Andra upplagan. EPA 600/R-99/064, U.S. Environmental Protection Agency, Duluth, MN, mars 2000.

(7) Kapitel C.27 i denna bilaga, Toxicitetstest i sediment- och vattenfas på chironomidlarver med spikat sediment

(8) Egeler, Ph., Römbke, J., Meller, M., Knacker, Th., Franke, C., Studinger, G. och Nagel, R. (1997). Bioaccumulation of lindane and hexachlorobenzene by tubificid sludgeworms (Oligochaeta) under standardised laboratory conditions. Chemosphere 35, 835–852.

(9) Ingersoll, C. G., Brunson, E. L., Wang N., Dwyer, F. J., Ankley, G. T., Mount D. R., Huckins J., Petty, J. och Landrum, P. F. (2003). Uptake and depuration of nonionic organic contaminants from sediment by the oligochaete, *Lumbriculus variegatus*. Environmental Toxicology and Chemistry 22, 872–885.

(10) Phipps, G. L., Ankley, G. T., Benoit, D. A. och Mattson, V. R. (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) Egeler, Ph., Römbke, J., Knacker, Th., Franke, C. och Studinger, G. (1999). Workshop on ”Bioaccumulation: Sediment test using benthic oligochaetes”, 26–27 april 1999, Hochheim/Main, Tyskland. Report on the R+D-project No. 298 67 419, Umweltbundesamt, Berlin.

(12) Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H. J. och Gilberg, D. (2006). Validation of a sediment bioaccumulation test with endobenthic aquatic oligochaetes by an international ring test. Rapport till den federala miljöbyrån (Umweltbundesamt Dessau), R&D nr: 202 67 437.

(13) Kelly, J. R., Levine, S. N., Buttel, L. A., Kelly, A. C., Rudnick, D. T. och Morton, R. D. (1990). Effects of tributyltin within a *Thalassia* seagrass ecosystem. Estuaries 13, 301–310.

▼M6

(14) Nendza, M. (1991). QSARs of bioaccumulation: Validity assessment of log Kow/log BCF correlations. I: R. Nagel och R. Loskill (red.): Bioaccumulation in aquatic systems. Contributions to the assessment. Proceedings of an international workshop, Berlin 1990. VCH, Weinheim.

(15) Landrum, P. F., Lee II, H. och Lydy, M. J. (1992). Toxicokinetics in aquatic systems: Model comparisons and use in hazard assessment. Environ. Toxicol. Chem. 11, 1709–1725.

(16) Markwell, R. D., Connell, D. W. och Gabric, A. J. (1989). Bioaccumulation of lipophilic compounds from sediments by oligochaetes. Wat. Res. 23, 1443–1450.

(17) Gabric, A. J., Connell, D. W. och Bell, P. R. F. (1990). A kinetic model for bioconcentration of lipophilic compounds by oligochaetes. Wat. Res. 24, 1225–1231.

(18) Kukkonen, J. och Landrum, P. F. (1994). Toxicokinetics and toxicity of sediment-associated Pyrene to *Lumbriculus variegatus* (Oligochaeta). Environ. Toxicol. Chem. 13, 1457–1468.

(19) Franke, C., Studinger, G., Berger, G., Böhling, S., Bruckmann, U., Cohors-Fresenborg, D. och Jöhncke, U. (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) Följande kapitel i denna bilaga:

Kapitel A.4, Ångtryck

Kapitel A.5 Ytspänning

Kapitel A.6, Vattenlöslighet

Kapitel A.8, Fördelningskoefficient, skakkolvmetoden

Kapitel A.24, Fördelningskoefficient, HPLC-metoden

Kapitel C.7, Nedbrytning – abiotisk nedbrytning: hydrolys som funktion av pH.

Kapitel C.4 A–F Bestämning av ”lätt” bionedbrytbarhet

Kapitel C.19 Uppskattning av adsorptionskoefficienten (K_{oc}) i jord och avloppsslam med användning av högtrycksvätskekromatografi (HPLC)

Kapitel C.29, Lätt bionedbrytbarhet – CO_2 i förslutna kärl (headspace-test)

(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) Antoine, M. D., Dewanathan, S. och Patonay, G. (1991). Determination of critical micelles concentration of surfactants using a near-infrared hydrophobicity probe. Microchem. J. 43, 165–172.

▼M6

(25) Beek, B., S. Boehling, U. Bruckmann, C. Franke, U. Joehncke och G. Studinger (2000). The assessment of bioaccumulation. I Hutzinger, O. (red.), The Handbook of Environmental Chemistry, Vol. 2, Del J (volymredaktör: B. Beek): Bioaccumulation – New Aspects and Developments. Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 235–276.

(26) Spacie, A. och Hamelink, J. L. (1982). Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. Environ. Toxicol. Chem. 1, 309–320.

(27) Hawker, D. W. och Connell, D. W. (1988). Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. Wat. Res. 22, 701–707.

(28) Brunson, E. L., Canfield, T. J., Ingersoll, C. J. och Kemble, N. E. (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) Reynoldson, T. B., Thompson, S. P. och Bamsey, J. L. (1991). A sediment bioassay using the tubificid oligochaete worm *Tubifex tubifex*. Environ. Toxicol. Chem. 10, 1061–1072.

(30) Aston, R. J. och Milner, A. G. P. (1981). Conditions for the culture of *Branchiura sowerbyi* (Oligochaeta: Tubificidae) in activated sludge. Aquaculture 26, 155–160.

(31) Marchese, M. R. och Brinkhurst, R. O. (1996). A comparison of two tubificid species as candidates for sublethal bioassay tests relevant to subtropical and tropical regions. Hydrobiologia 334, 163–168.

(32) Roghair, C. J. och Buijze, A. (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 denna bilaga, Test avseende akut toxicitet för fisk.

(34) OECD (1992c). Guidelines for Testing of Chemicals No. 210. Fish, Early-life Stage Toxicity Test. OECD, Paris.

(35) Kaster, J. L., Klump, J. V., Meyer, J., Krezoski, J. och Smith, M. E. (1984). Comparison of defecation rates of *Limnodrilus hoffmeisteri* using two different methods. Hydrobiologia 11, 181–184.

(36) Leppänen, M. T. och Kukkonen, J. V. K. 1998: Factors affecting feeding rate, reproduction and growth of an oligochaete *Lumbriculus variegatus* (Müller). Hydrobiologia 377, 183–194.

(37) Leppänen, M. T. och Kukkonen, J. V. K. 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) Leppänen, M. T. och Kukkonen, J. V. K. (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) Martinez-Madrid, M., Rodriguez, P., Perez-Iglesias, J. I. och Navarro, E. (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 denna bilaga, Toxicitet hos daggmaskar.

(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) Landrum, P. F. (1989). Bioavailability and toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed to sediments for the amphipod *Pontoporeia hoyi*. Environ. Sci. Toxicol. 23, 588–595.

(43) Poddubnaya, T. L. (1980). Life cycles of mass species of Tubificidae (Oligochaeta). I: R. O. Brinkhurst och 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) Hooftman, R. N., van de Guchte, K. och Roghair, C. J. (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) Franke, C. (1996). How meaningful is the bioconcentration factor for risk assessment?. Chemosphere 32, 1897–1905.

(47) Mount, D. R., Dawson, T. D. och Burkhard, L. P. (1999). Implications of gut purging for tissue residues determined in bioaccumulation testing of sediment with *Lumbriculus variegatus*. Environ. Toxicol. Chem. 18, 1244–1249.

(48) Randall, R. C., Lee II, H., Ozretich, R. J., Lake, J. L. och Pruell, R. J. (1991). Evaluation of selected lipid methods for normalising pollutant bioaccumulation. Environ.Toxicol. Chem. 10, 1431–1436.

(49) Gardner, W. S., Frez, W. A., Cichocki, E. A. och Parrish, C. C. (1985). Micromethods for lipids in aquatic invertebrates. Limnology and Oceanography, 30, 1099–1105.

(50) Bligh, E. G. och Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Physiol. 37, 911–917.

(51) De Boer, J., Smedes, F., Wells, D. och 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.

(52) Kristensen, P. (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) Zok, S., Görge, G., Kalsch, W. och Nagel, R. (1991). Bioconcentration, metabolism and toxicity of substituted anilines in the zebrafish (*Brachydanio rerio*). Sci. Total Environment 109/110, 411–421

(54) Nagel, R. (1988). Umweltchemikalien und Fische – Beiträge zu einer Bewertung. Habilitationsschrift, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Tyskland.

(55) Janssen, M. P. M., A. Bruins, T. H. De Vries och Van Straalen, N. M. (1991). Comparison of cadmium kinetics in four soil arthropod species. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 20, 305–312.

(56) Van Brummelen, T. C. och Van Straalen, N. M. (1996). Uptake and elimination of benzo(a)pyrene in the terrestrial isopod *Porcellio scaber*. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 31, 277–285.

▼M6

(57) Sterenborg, I., Vork, N. A., Verkade, S. K., Van Gestel, C. A. M. och Van Straalen, N. M. (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) Suedel, B. C. och Rodgers, J. H. (1994). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. Environ. Toxicol. Chem. 13, 1163–1175.

(59) Wachs, B. (1967). Die Oligochaeten-Fauna der Fließgewässer unter besonderer Berücksichtigung der Beziehung zwischen der Tubificiden-Besiedlung und dem Substrat. Arch. Hydr. 63, 310–386.

(60) Oliver, B. G. (1987). Biouptake of chlorinated hydrocarbons from laboratory-spiked and field sediments by oligochaete worms. Environ. Sci. Technol. 21, 785–790.

(61) Chapman, P. M., Farrell, M. A. och Brinkhurst, R. O. (1982a). Relative tolerances of selected aquatic oligochaetes to individual pollutants and environmental factors. Aquatic Toxicology 2, 47–67.

(62) Chapman, P. M., Farrell, M. A. och Brinkhurst, R. O. (1982b). Relative tolerances of selected aquatic oligochaetes to combinations of pollutants and environmental factors. Aquatic Toxicology 2, 69–78.

(63) Rodriguez, P. och Reynoldson, T. B. (1999). Laboratory methods and criteria for sediment bioassessment. I: A. Mudroch, J. M. Azcue och P. Mudroch (red.): Manual of Bioassessment of aquatic sediment quality. Lewis Publishers, Boca Raton, CRC Press LLC.

(64) Brinkhurst, R. O. (1971). A guide for the identification of British aquatic oligochaeta. Freshw. Biol. Assoc., Sci. Publ. No. 22.

(65) Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H. J. och Gilberg, D. (2005). Validation of a sediment toxicity test with the endobenthic aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus* by an international ring test. I samarbete med R. Nagel och B. Karaoglan. Rapport till den federala miljöbyrån (Umweltbundesamt Berlin), R&D nr: 202 67 429.

(66) Aston, R. J., Sadler, K. och Milner, A. G. P. (1982). The effect of temperature on the culture of *Branchiura sowerbyi* (Oligochaeta: Tubificidae) on activated sludge. Aquaculture 29, 137–145.

(67) Roghair, C. J., Buijze, A., Huys, M. P. A., Wolters-Balk, M. A. H., Yedema, E. S. E. och Hermens, J. L. M. (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) Aston, R. J. (1984). The culture of *Branchiura sowerbyi* (Tubificidae, Oligochaeta) using cellulose substrate. Aquaculture 40, 89–94.

(69) Bonacina, C., Pasteris, A., Bonomi, G. och Marzuoli, D. (1994). Quantitative observations on the population ecology of *Branchiura sowerbyi* (Oligochaeta, Tubificidae). Hydrobiologia, 278, 267–274.

▼M7

C.47 TOXICITETSTEST PÅ FISK I TIDIGA LEVNADSSTADIER

INLEDNING

1. Denna testmetod motsvarar OECD:s testriktlinje (TG) 210 (2013). Tester på fisk i tidiga levnadsstadier är avsedda att definiera letala och subletala effekter av kemikalier i de stadier och arter som testas. De ger information av värde för skattningen av kemikaliens kroniska letala och subletala effekter på andra fiskarter.

2. Testriktlinje 210 baseras på ett förslag från Storbritannien. Förslaget diskuterades vid ett möte med OECD-experter i Medmenham (Storbritannien) i november 1988 och uppdaterades ytterligare 2013 för att avspegla erfarenheten från användningen av testet samt rekommendationer från en OECD-arbetsgrupp i september 2010 om testning av toxicitet för fisk (1).

TESTPRINCIP

3. Fisk i tidiga levnadsstadier exponeras för en serie koncentrationer av testkemikalien upplöst i vatten. Genomflödessystem är att föredra, men om det inte är möjligt är semistatiska system godtagbara. För närmare uppgifter bör OECD:s vägledningsdokument om akvatisk toxicitetstestning av svåra ämnen och blandningar konsulteras (2). Testet inleds med att befruktade ägg placeras i testbehållare och får fortgå under en artspecifik tidsperiod som är nödvändig för att kontrollfisken ska nå yngelstadiet. Letala och subletala effekter bedöms och jämförs med kontrollvärden för att bestämma den lägsta koncentrationen med observerad effekt (LOEC), i syfte att bestämma i) noll-effektkoncentration (NOEC) och/eller ii) EC_x (t.ex. EC10, EC20) med hjälp av en regressionsmodell för att uppskatta den koncentration som skulle orsaka en förändring av den uppmätta effekten på x %. Rapporteringen av relevanta effektkoncentrationer och parametrar kan bero på regelverket. EC_x bör ligga inom intervallet av testkoncentrationer så att EC_x interpoleras snarare än extrapoleras (se tillägg 1 för definitioner).

INFORMATION OM TESTKEMIKALIEN

4. Testkemikalien avser vad som testas. Testkemikaliens vattenlöslighet (se kapitel A.6 i denna bilaga) och ångtryck (se kapitel A.4 i denna bilaga) bör vara kända och det bör finnas tillgång till en tillförlitlig analysmetod med känd och rapporterad noggrannhet och kvantifieringsgräns för att kvantifiera kemikalien i testlösningarna. Även om det inte är nödvändigt att genomföra testet kan resultaten från ett test av akut toxicitet (se kapitel C.1 eller C.49 i denna bilaga), företrädesvis med samma art som används för detta test, ge användbar information.

5. Om testmetoden används för att testa en blandning bör dess sammansättning karakteriseras så långt detta är möjligt, t.ex. genom beståndsdelarnas kemiska identitet, deras kvantitativa förekomster och deras ämnesspecifika egenskaper (såsom de som nämns ovan). Innan testmetoden för lagstadgad testning av en blandning används bör man överväga om den kommer att ge godtagbara resultat för det avsedda tillsynsändamålet.

6. Till information som bör anges hör bl.a. testämnets strukturformel, renhet, vattenlöslighet, stabilitet i vatten och ljus, pK_a, P_{ow} och resultaten från test avseende biologisk lättnedbrytbarhet (t.ex. kapitel C.4 eller C.29 i denna bilaga).

▼M7

TESTETS GILTIGHET

7. För att ett test ska vara giltigt måste följande villkor uppfyllas:

— Koncentrationen löst syre bör vara > 60 % av luftmättnadsvärdet under hela testet.

— Under testet bör vattentemperaturen inte variera med mer än ± 1,5 °C mellan olika testbehållare eller mellan påföljande dagar. Vattentemperaturen bör hållas inom de temperaturgränser som specificerats för den art som används (tillägg 2).

— Analytisk mätning av testkoncentrationerna är obligatorisk.

— Den totala överlevnaden för de befruktade äggen samt framgångsfrekvens efter kläckning i kontrollgrupperna och, i tillämpliga fall, i kontrollerna med lösningsmedel, måste vara större än eller lika med de gränsnivåer som anges i tillägg 2.

8. Om en mindre avvikelse från giltighetskriterierna observeras bör konsekvenserna av detta betraktas i förhållande till testuppgifternas tillförlitlighet. Dessa överväganden bör ingå i rapporten. Effekter på överlevnad, kläckning eller tillväxt som uppstår i lösningsmedelskontrollen jämfört med den negativa kontrollen ska rapporteras och diskuteras mot bakgrund av testuppgifternas tillförlitlighet.

BESKRIVNING AV TESTMETODEN

Testbehållare

9. Alla typer av kärl av glas, rostfritt stål eller andra kemiskt inerta kärl kan användas. Eftersom det är känt att silikon har en stark absorptionsförmåga i fråga om lipofila ämnen, bör användningen av silikonrör i genomflödesstudier och silikonlock som är i kontakt med vatten minimeras genom att t.ex. använda modulglasakvarier. Kärlen bör vara tillräckligt stora för att möjliggöra ordentlig tillväxt i kontrollgruppen, underhåll av koncentrationen löst syre (för små fiskarter uppnås detta t.ex. genom en sjulitersbehållare) och efterlevnad av de kriterier för lämplig fisktäthet som anges i punkt 19. Testbehållarna ska helst placeras slumpvis i testutrymmet. En randomiserad blockutformning med en behandling per block är att föredra framför en fullständigt randomiserad utformning. Testbehållarna bör avskärmas från oönskade störningar. Testsystemet bör helst konditioneras med koncentrationer av testämnet under en tillräckligt lång tid för att uppvisa stabila exponeringskoncentrationer innan testorganismer tillsätts.

Val av art

10. Rekommenderade fiskarter anges i tabell 1. Det hindrar inte att andra arter används, men då måste testförfarandet eventuellt justeras så att lämpliga testförhållanden kan säkerställas. I ett sådant fall måste testrapporten innehålla en motivering för valet av art och testmetod.

Hållande av avelsfisk

11. Närmare uppgifter om lämplig förvaring av avelsbeståndet finns i tillägg 3 och i hänvisningarna (3), (4), (5).

Hantering av befruktade ägg, embryon och yngel

12. Fertiliserade ägg, embryon och yngel kan till en början exponeras i mindre kärl av glas eller rostfritt stål, placerade i huvudkärlet, med sidor eller ändar

▼M7

av nät som möjliggör ett flöde av testlösning genom kärlet. För att få ett icke-turbulent flöde genom dessa små kärl kan de hållas hängande från en arm som sänker och höjer kärlen (de får dock inte höjas över ytan). Befruktade ägg av laxfiskar kan hållas på ställningar eller galler med så stora öppningar att ynglen kan falla igenom efter kläckningen.

13. Om äggbehållare, galler eller nät har använts för att hålla äggen inom huvudkärlet tas dessa tillbehör bort efter att ynglen har kläckts, enligt vägledningen i tillägg 3, med undantag av nät som behövs för att hålla ynglen på plats. Om ynglen måste flyttas får de inte utsättas för luft, och håvar får inte användas för att släppa ut ynglen från äggbehållarna. Överföringstidpunkten varierar beroende på art och bör dokumenteras i rapporten. Det är dock inte alltid nödvändigt med en överföring.

Vatten

14. Allt vatten i vilket testarten uppvisar lämplig långsiktig överlevnad och tillväxt kan användas som testvatten (se tillägg 4). Vattnet ska hålla jämn kvalitet under hela testperioden. För att säkerställa att utspädningsvattnet inte påverkar testresultaten på oönskat sätt (t.ex. genom komplexbildning med testkemikalien) eller har skadliga verkningar på avelsbeståndets prestanda, ska vattenprover tas regelbundet för analys. Mätningar av tungmetaller (t.ex. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), viktiga anjoner och katjoner (t.ex. Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-}, SO_4^{2-}), ammoniak, totala återstoden av klorhaltiga bekämpningsmedel, totala halten organiskt kol och uppslammade partiklar bör göras t.ex. halvårsvis i fall där man vet att utspädningsvattnet håller en relativt jämn kvalitet. Om man vet att vattnet är av varierande kvalitet måste mätningarna utföras oftare. Frekvensen beror på hur variabel kvaliteten är. I tillägg 4 anges ett antal kemiska egenskaper för godtagbart utspädningsvatten.

Testlösningar

15. För genomflödestest behövs ett system som kontinuerligt portionerar och späder ut en stamlösning av testkemikalien (t.ex. med mätpump, proportionalitetslösningssystem, mättnadskärlsystem) för att tillföra en serie koncentrationer till testbehållarna. Stamlösningens och utspädningsvattnets flödeshastighet bör kontrolleras regelbundet under testets gång och får inte variera med mer än 10 % under hela testet. En flödeshastighet som motsvarar minst fem testbehållarvolymer per 24 timmar har konstaterats vara lämplig (3). Om den fisktäthet som anges i punkt 19 följs, är dock en lägre flödeshastighet på t.ex. 2–3 testbehållarvolymer möjlig för att förhindra att fodret försvinner snabbt.

16. Testlösningar med de valda koncentrationerna bereds genom utspädning av en stamlösning. Stamlösningen bör helst beredas genom att man helt enkelt blandar eller skakar testkemikalien i utspädningsvattnet på mekanisk väg (t.ex. omrörning och/eller ultraljud). Mättnadskolonner (löslighetskolonner) eller passiva doseringsmetoder (6) kan användas för att få en stamlösning med lämplig koncentration. Användning av lösningsmedel som bärämne rekommenderas inte. Om det är nödvändigt att använda lösningsmedel bör man införa en lösningsmedelskontroll som testas parallellt med samma lösningsmedelskoncentration som i de kemiska behandlingarna, dvs. lösningsmedelshalten bör helst vara lika i alla koncentrationer och i lösningsmedelskontrollen. För vissa utspädningssystem kan detta vara tekniskt svårt. I dessa

▼M7

fall bör lösningsmedelskoncentrationen i lösningsmedelskontrollen vara lika med den högsta lösningsmedelskoncentrationen i behandlingsgruppen. För ämnen som är svåra att testa bör OECD:s vägledningsdokument nr 23 om akvatisk toxicitetstestning av svåra ämnen och blandningar konsulteras (2). Om lösningsmedel används avgörs valet av lösningsmedel av ämnets kemiska egenskaper. I OECD:s vägledningsdokument nr 23 rekommenderas en maximal koncentration på 100 µl/l. För att undvika eventuella effekter av lösningsmedlet på de endpoints som mäts (7) rekommenderas en så låg koncentration av lösningsmedel som möjligt.

17. Vid semistatiskt test kan man välja mellan två olika förnyelseförfaranden. Antingen kan nya testlösningar beredas i rena kärl och de överlevande äggen och ynglen försiktigt överföras till de nya kärlen, eller så kan testorganismerna vara kvar i kärlen medan en andel (minst två tredjedelar) av testlösningen/kontrollvolymen byts ut.

FÖRFARANDE

Exponeringsförhållanden

Löptid

18. Testet bör inledas så snart som möjligt efter det att äggen befruktats. Äggen ska helst nedsänkas i testlösningarna innan klyvningen av blastodisken inleds, eller så snart som möjligt efter denna tidpunkt. Testperiodens längd beror på den art som används. Vissa rekommendationer gällande testperiodens längd finns i tillägg 2.

Fisktäthet

19. Antalet befruktade ägg vid testperiodens början bör vara tillräckligt med tanke på statistiska krav. Äggen fördelas slumpmässigt mellan behandlingsgrupperna. För varje koncentration bör minst 80 ägg användas, jämnt fördelade mellan minst fyra likadana testbehållare per koncentration. Fisktätheten (biomassa per volym testlösning) får inte vara högre än att man kan hålla koncentrationen löst syre på minst 60 % av luftmättnadsvärdet (ASV) utan luftning under ägg- och yngelstadiet. För genomflödestest rekommenderas en fisktäthet som inte överskrider 0,5 g/l våtvikt per 24 timmar och som under inga omständigheter överskrider 5 g/l lösning (3).

Ljus och temperatur

20. Fotoperioden och vattentemperaturen bör vara anpassade för den art som testas (se tillägg 2).

Utfodring

21. Foder och utfodring är av avgörande betydelse, och det är viktigt att man vid lämpliga tidpunkter ger rätt foder för varje levnadsstadium och i en tillräckligt stor mängd för att stödja normal tillväxt. Utfodringen bör vara ungefär lika i alla replikat om mängden inte justeras för att ta hänsyn till dödlighet. Överbliven mat och avföring bör avlägsnas, om så behövs, för att undvika ackumulering av avfallsprodukter. Detaljerade utfodringssystem anges i tillägg 3, men allteftersom man vinner nya erfarenheter rationaliseras utfodringssystemen kontinuerligt för att förbättra överlevnaden och optimera tillväxten. Levande foder utgör en källa till miljöberikning och bör därför användas i stället för eller som komplement till torkad eller fryst mat, när så är lämpligt för arten och levnadsstadiet.

Testkoncentrationer

22. I regel krävs fem koncentrationer med minst fyra replikat per koncentration och ett fast koncentrationsförhållande som inte överstiger 3,2. Om information om testning av akut toxicitet finns tillgänglig, företrädesvis med samma art och/eller ett intervallbestämmande test, bör sådana uppgifter beaktas (1) vid valet av lämpliga testkoncentrationer. Alla informationskällor

▼M7

bör dock övervägas vid valet av lämpliga testkoncentrationer, inklusive källor som t.ex. jämförelser med strukturlika ämnen och testdata för akut toxicitet för fiskembryon. Ett gränstest eller en utökat gränstest med färre än fem koncentrationer som definitivt test kan vara godtagbart om endast empiriska NOEC ska fastställas. Om färre än fem koncentrationer används måste detta motiveras. Testkemikaliekoncentrationer som är högre än LC_{50} under 96 timmar eller 10 mg/l, beroende på vilken som är lägre, behöver inte testas.

Kontroller

23. En kontrollsats med utspädningsvatten och, vid behov, en kontrollsats med endast lösningsmedlet bör köras utöver serierna med testkemikaliekoncentrationer (se punkt 16).

Frekvens för analytiska bestämningar och mätningar

24. Innan exponeringsperioden inleds bör man se till att systemet för kemisk tillförsel fungerar i alla replikat (t.ex. genom att mäta testkoncentrationerna). Nödvändiga analytiska metoder bör fastställas, inklusive en lämplig kvantifieringsgräns (LOQ), och det är viktigt att inhämta tillräcklig kunskap om ämnets stabilitet i testsystemet. Under testets gång bestäms testkemikaliens koncentrationer med jämna mellanrum för att karakterisera exponeringen. Minst fem bestämningar behövs. I genomflödessystem bör analytiska mätningar av den undersökta kemikalien utföras i ett replikat per koncentration åtminstone en gång i veckan genom att systematiskt mäta olika replikat. Ytterligare analytiska bestämningar förbättrar ofta kvaliteten på testresultatet. Proverna kan behöva filtreras för att avlägsna eventuella partiklar (t.ex. med porstorlek 0,45 μm) eller centrifugeras för att se till att de analytiska bestämningarna görs på kemikalien i en äkta lösning. Filtren bör vara mättade före användning i syfte att minska adsorption av testkemikalien. När de uppmätta koncentrationerna inte håller sig inom 80–120 % av den nominella koncentrationen bör effektkoncentrationerna bestämmas och uttryckas i förhållande till koncentrationens aritmetiska medelvärde för genomflödestest (se tillägg 6 till testmetod C.20 för beräkning av det aritmetiska medelvärdet (8)), och uttryckas i förhållande till det geometriska medelvärdet av de uppmätta koncentrationerna för semistatiska tester (se kapitel 5 i OECD:s vägledningsdokument om akvatisk toxicitetstestning av svåra ämnen och blandningar (2)).

25. Under testets gång bör löst syre, pH och temperatur mätas i alla testkärl minst en gång i veckan. Salthalt och hårdhet, om relevant, bör mätas i början och slutet av testet. Temperaturen bör helst övervakas kontinuerligt i minst ett testkärl.

Observationer

26. **Stadiet för embryonal utveckling**: Det embryonala stadiet när exponeringen för testämnet inleds bör bekräftas så exakt som möjligt. Detta kan göras på ett representativt prov av ägg som har förvarats och rengjorts på lämpligt sätt.

27. **Kläckning och överlevnad**: observationer av kläckning och överlevnad bör göras minst en gång per dag. Alla antal bör registreras. Om svamp observeras på äggen i ett tidigt skede av embryoutvecklingen (t.ex. dag ett eller två av testet), bör dessa ägg räknas och tas bort. Döda embryon, yngel och ungfisk bör avlägsnas så snart de observeras, eftersom de snabbt kan förruttna och sönderdelas av de andra fiskarna. Yttersta försiktighet bör iakttas när döda individer avlägsnas så att man inte orsakar fysiska skador på närliggande ägg eller yngel. Tecken på dödlighet varierar beroende på art och levnadsstadium. Exempel:

▼M7

— Befruktade ägg: särskilt i tidiga stadier en tydlig förlust av genomskinlighet och färgförändringar orsakade av koagulering eller utfällning av protein, vilket leder till ett vitt ogenomskinligt utseende.

— Embryon, yngel och ungfiskar: orörlighet och/eller avsaknad av andningsrörelse och/eller avsaknad av hjärtslag och/eller avsaknad av reaktion på mekanisk retning.

28. **Onormalt utseende**: antalet yngel eller ungfisk som har onormal kroppsform bör registreras med intervall vars längd bestäms enligt testperiodens längd och karaktären hos de abnormiteter det gäller. Det bör noteras att onormala yngel och ungfiskar även förekommer av naturliga skäl, och kan för vissa arter uppgå till flera procent i kontrollen eller kontrollerna. Om missbildningar och relaterat onormalt beteende anses så svåra att organismen orsakas väsentligt lidande och den har nått en punkt där den inte kommer att återhämta sig kan organismen tas bort från testet. Sådana djur bör avlivas och anges som döda i den påföljande dataanalysen. Normal embryoutveckling har dokumenterats för de flesta arter som rekommenderas i denna metod (9) (10) (11) (12).

29. **Onormalt beteende**: abnormiteter som hyperventilation, okoordinerat simmande, atypisk passivitet och atypiskt utfodringsbeteende bör registreras med lämpliga intervall beroende på testperiodens längd (t.ex. en gång om dagen för varmvattensarter). Sådana verkningar kan vara svåra att kvantifiera men kan, när de observeras, vara till hjälp vid tolkningen av dödlighetsdata.

30. **Vikt**: i slutet av testet vägs alla överlevande fiskar minst per replikat (antal djur i replikatet samt djurens medelvikt rapporteras). Våtvikt (avtorkning) är att föredra, men även torrviktsdata kan rapporteras (13).

31. **Längd**: vid testets slut mäts individuella längder. Total längd rekommenderas, men om det förekommer röta på stjärtfenan eller frätning av fenorna kan standardlängd användas. Samma metod bör användas för all fisk i ett givet test. Individuell längd kan mätas med t.ex. skjutmått, digital kamera eller kalibrerad okulär mikrometer. Vanliga minimilängder anges i tillägg 2.

DATA OCH RAPPORTERING

Behandling av resultaten

32. Försöket och urvalet av det statistiska testet bör utformas för att ge tillräcklig effekt (80 % eller högre) så att det är möjligt att upptäcka förändringar av biologisk betydelse i endpoints när NOEC ska rapporteras. Rapporteringen av relevanta effektkoncentrationer och parametrar kan bero på regelverket. Om en effektkoncentration (EC_x) ska rapporteras bör utformningen av försöket och valet av regressionsmodell möjliggöra uppskattning av EC_x, så att i) det 95-procentiga konfidensintervall som rapporteras för EC_x inte innehåller noll och inte är alltför brett, ii) det 95-procentiga konfidensintervallet för det beräknade medelvärdet vid EC_x inte innehåller kontrollmedelvärdet, och iii) det inte finns betydande ”lack-of-fit” (bristande anpassning) för regressionsmodellen jämfört med data. Båda tillvägagångssätten kräver identifiering av den procentuella förändring i varje endpoint som det är viktigt att upptäcka eller uppskatta. Försöket bör utformas för att möjliggöra denna identifiering. När ovannämnda villkor för att bestämma EC_x inte är uppfyllda bör NOEC-metoden användas. Samma procentuella förändringar är sannolikt inte tillämpliga på alla endpoints, och det är inte heller sannolikt att man kan utforma försök som uppfyller ovannämnda kriterier för alla endpoints. Därför är det viktigt att fokusera på de endpoints som är relevanta för varje försök

▼M7

för att kunna utforma försöket på lämpligt sätt. Statistiska flödesdiagram och vägledning för varje metod finns i tilläggen 5 och 6, med riktlinjer för databehandling och råd för att underlätta valet av lämpligaste statistiska test eller metod. Andra statistiska metoder kan användas under förutsättning att de är vetenskapligt motiverade.

33. Det är nödvändigt att analysera variationerna inom varje replikatgrupp med hjälp av variansanalys eller kontingenstabellprocedurer. Lämpliga statistiska analysmetoder bör användas baserat på denna analys. För multipla jämförelser mellan resultaten vid enskilda koncentrationer och resultaten för kontrollerna rekommenderas Jonckheere-Terpstras step-down-test eller Williams test för kontinuerlig respons och Cochran-Armitages step-down-test för dikotom respons som överensstämmer med en monoton koncentrationsrespons där bevis saknas för extrabinomial varians (14). När det finns bevis för extrabinomial varians rekommenderas Rao-Scott-modifieringen av Cochran-Armitage-testet (15) (16), eller Williams- eller Dunnetts-testet (efter en arcsin-kvadratrot-transformation) eller Jonckheere-Terpstra-testet för att reproducera proportionerna. Om uppgifterna inte överensstämmer med en monoton koncentrationsrespons kan Dunnetts-, Dunns- eller Mann-Whitney-metoderna vara användbara för kontinuerlig respons, och Fishers exakta test för dikotom respons (14) (17) (18). Statistiska metoder eller modeller bör användas med försiktighet så att man säkerställer att kraven för metoden eller modellen är uppfyllda (variationer mellan behållare ska t.ex. uppskattas och anges i det försök eller de tester och modeller som används). Uppgifterna ska utvärderas för normalitet. Information om hur rester från ANOVA bör hanteras ges i tillägg 5. I tillägg 6 diskuteras ytterligare överväganden i samband med regressionsmetoden. Förändringar för att uppfylla kraven för statistiska tester bör övervägas. Transformationer för att anpassa en regressionsmodell kräver dock stor omsorg. En förändring på 25 % i den otransformerade responsen motsvarar inte en förändring på 25 % i en transformerad respons. För alla analyser gäller att analysenheten inte är den enskilda fisken, utan testbehållaren. Försöksenheten och både hypotesprövningarna och regressionen bör därför avspegla detta (3) (14) (19) (20).

Testrapport

34. Testrapporten ska innehålla följande information:

Testkemikalie:

Monokomponentämne:

— fysiskt utseende, vattenlöslighet och ytterligare relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper,

— kemisk beteckning, såsom IUPAC- eller CAS-namn, CAS-nummer, SMILES- eller InCh-kod, strukturell formel, renhet, kemisk beteckning för orenheter i förekommande fall och när så är praktiskt möjligt osv. (vid behov, inklusive halten organiskt kol).

Multikomponentämne, UVCB och blandningar:

— karakteriseras så långt som möjligt, t.ex. genom kemisk beteckning (se ovan), kvantitativ förekomst och relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper hos komponenterna.

Testade arter:

— vetenskapligt namn, stam, härkomst och metod för insamling av befruktade ägg och efterföljande hantering.

▼M7

Testbetingelser:

— använt testförfarande (t.ex. semistatiskt, genomflöde, fisktäthet),

— ljusperiod(er).

— testets upplägg (t.ex. antal testbehållare och replikat, antal ägg per replikat, testbehållarens material och storlek (höjd, bredd, volym), vattenvolym per testbehållare),

— metoden för beredning av stamlösningar och förnyelsefrekvensen (i förekommande fall bör även solubiliseringsmedlet och dess koncentration anges),

— doseringsmetod för testkemikalien (t.ex. pumpar, utspädningssystem),

— metodens återvinningseffektivitet och nominella testkoncentrationer, kvantifieringsgränsen, de uppmätta värdenas medelvärden och deras standardavvikelser i testkärlen samt den metod med vilken dessa erhölls och bevis för att mätningarna hänför sig till testkemikaliens koncentrationer i en äkta lösning,

— utspädningsvattnets egenskaper: pH, hårdhet, koncentrationen löst syre, restklornivåer (om de har uppmätts), totalt organiskt kol (om det har uppmätts), uppslammade partiklar (om det har uppmätts), testmediets salthalt (om den har uppmätts) och resultatet av alla övriga mätningar,

— vattenkvaliteten i testkärlen: pH, hårdhet, temperatur och koncentrationen löst syre,

— detaljerade uppgifter om utfodringen (t.ex. typ av foder, källa, hur mycket fiskarna har fått och hur ofta).

Resultaten rapporteras individuellt (eller per replikat) och som medelvärde och variationskoefficient, när så är lämpligt, för följande endpoints:

— bevis för att kontrollerna uppfyller normerna för total överlevnad för testdjur (tillägg 2),

— data om dödlighet i varje stadium (embryo-, yngel- och ungfiskstadiet) och kumulativ dödlighet,

— antalet dagar fram till kläckning, antal kläckta yngel per dag och tidpunkten för kläckningens slut,

— antal friska exemplar vid testets avslutning,

— data om längd (ange antingen standard eller totalt) och vikt för överlevande djur,

— förekomst, beskrivning av och antal morfologiska abnormiteter (i förekommande fall),

— förekomst, beskrivning av och antal beteendemässiga effekter (i förekommande fall),

— metod för den statistiska analysen (regressionsanalys eller variansanalys) samt databehandling (använt statistiskt test eller använd modell),

— nolleffektkoncentration (NOEC) för varje respons som har varit föremål för bedömning,

▼M7

— lägsta koncentration med observerad effekt (vid p = 0,05) för varje bedömd respons (LOEC),

— EC_x för varje bedömd respons (i förekommande fall) samt konfidensintervall (t.ex. 90 % eller 95 %) och kurvan för den anpassade modell som använts för att beräkna EC_x, lutningen för koncentration-responskurvan, formeln för regressionsmodellen och uppskattade modellparametrar och deras standardfel.

Eventuella avvikelser från testmetoden.

Diskussion av resultaten, inbegripet eventuell inverkan på testresultatet av avvikelser från denna testmetod.

Tabell 1

Fiskarter som rekommenderas för testning

SÖTVATTEN	BRACK- och HAVSVATTEN
Oncorhynchus mykiss Regnbåge	*Cyprinodon variegatus* Sheepshead minnow (art av tandkarp)
Pimephales promelas Knölskallelöja	*Menidia* sp. Silverlax
Danio rerio Sebrafisk	
Oryzias latipes Medaka (japansk risfisk)	

LITTERATUR

(1) OECD (2012), Fish Toxicity Testing Framework, Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment nr 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. nr 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. s. 26 ff.

(4) Brauhn, J.L. och 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. och 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, m.fl. (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. m.fl. (2006), Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review, Aquatic Toxicology, 76, 69–92.

(8) Kapitel C.20 i denna bilaga, Reproduktionstest på *Daphnia magna*.

(9) Hansen, D.J. och P.R. Parrish (1977), Suitability of sheepshead minnows (Cyprindon variegatus) for life-cycle toxicity tests, In Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (redigerad av F.L. Mayer och J.L. Hamelink), ASTM STP 634.

(10) Kimmel, H. B. m.fl. (1995), Stages of embryonic development of the zebrafish. Developmental Dynamics, 203:253–310.

▼M7

(11) Gonzalez-Doncel, M. m.fl. (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. m.fl. (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 och 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 nr 54, OECD, Paris.

(15) Rao, J. N. K. och A. J. Scott (1992), A simple method for the analysis of clustered binary data, Biometrics 48, 577–585.

(16) Rao, J. N. K. och 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 Ameican Statistical Association, 50, 1096-1121.

(18) Dunnett, C. W. (1964). New Tables for Multiple Comparisons with a Control. Biometrics, 20, 482–491.

(19) Rand, G.M. och S.R. Petrocelli (1985), Fundamentals of Aquatic Toxicology. Hemisphere Publication Corporation, New York.

(20) McClave, J.T., J.H. Sullivan och J.G. Pearson (1980). Statistical Analysis of Fish Chronic Toxicity Test Data, Proceedings of 4th Aquatic Toxicology Symposium, ASTM, Philadelphia.

▼M7

Tillägg 1

DEFINITIONER

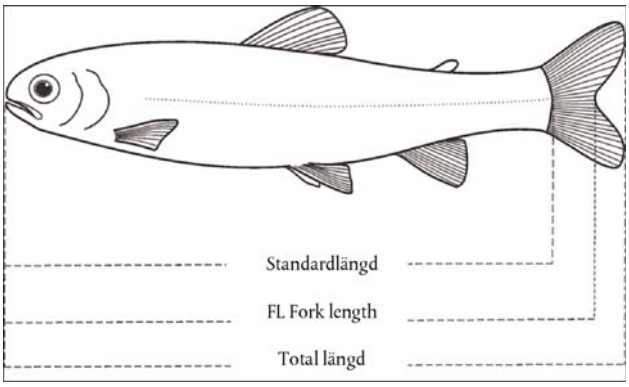
FL: längd från nosspetsen till stjärtfenans delning, används för fiskarter där det är svårt att säga var ryggraden slutar (www.fishbase.org)

SL: standardlängd, längd från nosspetsen till bakre delen av den sista ryggkotan eller bakre slutet av den mellersta delen av hypuralplattan. Enkelt uttryckt utesluter denna mätning stjärtfenans längd. (www.fishbase.org)

TL: total längd, längd från nosspetsen till slutet av stjärtfenans längre flik, mäts vanligen med flikarna komprimerade längs mittlinjen. Detta är ett linjärt mått, som inte mäter kroppskurvan (www.fishbase.org)

Figur 1

Beskrivning av de olika längder som används



Kemikalie: ett ämne eller en blandning.

EC_x: (koncentration som orsakar x % effekt): den koncentration som orsakar en x-procentig effekt på testorganismerna inom en given exponeringstid jämfört med ett kontrollprov. EC_{50} är till exempel den koncentration som beräknas ha en effekt på en av testets endpoints i 50 % av en exponerad population under en fastställd exponeringstid.

Lägsta koncentration med observerad effekt (LOEC): den lägsta testade koncentration vid vilken man kan fastställa att testkemikalien har en statistiskt signifikant effekt (vid $p < 0,05$) jämfört med kontrollen. Alla testkoncentrationer ovanför LOEC bör ha skadliga verkningar som är lika stora som eller större än de verkningar som observeras vid LOEC. Om dessa två villkor inte är uppfyllda bör en fullständig förklaring ges till hur man har valt LOEC (och därmed NOEC). Vägledning ges i tilläggen 5 och 6.

Nolleffektkoncentration (NOEC): den testkoncentration omedelbart under LOEC som inom en fastställd exponeringsperiod inte framkallar några statistiskt signifikanta verkningar ($p < 0,05$) jämfört med kontrollen.

Testkemikalie: alla ämnen eller blandningar som testas med denna testmetod.

UVCB-ämne: ämne med okänd eller varierande sammansättning, komplexa reaktionsprodukter eller biologiskt material.

IUPAC: Internationella kemiunionen.

SMILES: Simplified Molecular Input Line Entry Specification

▼M7

Tillägg 2

TESTBETINGELSER, TESTPERIOD OCH ÖVERLEVNADSKRITERIER FÖR REKOMMENDERADE ARTER

ARTER	TESTBETINGELSER			REKOMMENDERAD LÄNGD FÖR TESTPERIODEN	Normal minsta genomsnittliga totallängd för kontrollfisk i slutet av undersökningen (mm) ([1])	ÖVERLEVNAD I KONTROLLER (minimum)	
	Temperatur (°C)	Salthalt ($^0/_{00}$)	Fotoperiod (timmar)			Kläckningsframgång	Framgång efter kläckning
Sötvatten:							
Oncorhynchus mykiss Regnbåge	10 ± 1,5 ([2])		12–16 ([3])	2 veckor efter det att kontrollerna börjar födosöka (eller 60 dagar efter kläckning)	40	75 %	75 %
Pimephales promelas Knölskallelöja	25 ± 1,5		16	32 dagar från testets början (eller 28 dagar efter kläckning)	18	70 %	75 %
Danio rerio Sebrafisk	26 ± 1,5		12–16 ([4])	30 dagar efter kläckning	11	70 %	75 %
Oryzias latipes Medaka (japansk risfisk)	25 ± 2		12–16 ([4])	30 dagar efter kläckning	17	80 %	80 %
Brack- och havsvatten:							
Cyprinodon variegatus Sheepshead minnow (art av tandkarp)	25 ± 1,5	15–35 ([5])	12–16 ([4])	32 dagar från testets början (eller 28 dagar efter kläckning)	17	75 %	80 %
***Menidia* sp.** Silverlax	22–25	15–35 ([5])	13	28 dagar	20	80 %	60 %

Teckenförklaring:

([1]) Minsta genomsnittliga totallängd är vanligen inte ett giltighetskriterium, men avvikelser under den angivna siffran bör undersökas noggrant när det gäller testets sensitivitet. Den minsta genomsnittliga totallängden härleds från ett urval av uppgifter som finns tillgängliga vid den aktuella tidpunkten.

([2]) Den särskilda stam av regnbåge som testas kan kräva andra temperaturer. Avelsbestånd måste hållas vid samma temperatur som ska användas för äggen. När ägg mottas från kommersiella uppfödare krävs en kort anpassningsperiod (t.ex. 1–2 timmar) för att testa temperaturen efter ankomst.

([3]) Mörker för yngel tills det gått en vecka efter kläckning, utom när de inspekteras. Därefter dämpad belysning under hela testet (12–16 timmars ljusperiod) ([4]).

([4]) Ljusregimen bör vara konstant för varje testningsförhållande.

([5]) Salthalten ska hållas inom ± 2 $^0/_{00}$ för varje test.

▼M7

Tillägg 3

VÄGLEDNING OM UTFODRING OCH HANTERING AV FISKYNGEL OCH TESTDJUR FRÅN REKOMMENDERADE ARTER

ARTER	FODER (*)				ÖVERFÖRINGSTIDPUNKT EFTER KLÄCKNING	TID TILL FÖRSTA UTFODRING
	Fiskyngel	Nyligen kläckta yngel	Ungfisk			
			Typ	Frekvens		
Sötvatten:						
Oncorhynchus mykiss Regnbåge	Öringfoder	Inget ([a])	Startfoder för öring, BSN	2–4 utfodringar per dag	14–16 dagar efter kläckning eller när de simmar upp (ej nödvändigt)	19 dagar efter kläckning eller när de simmar upp
Pimephales promelas Knölskallelöja	BSN, flingfoder, FBS	BSN	BSN48, flingfoder	2–3 gånger om dagen	När kläckningen är 90 %	2 dagar efter kläckning
Danio rerio Sebrafisk	BSN, flingfoder	Kommersiellt yngelfoder, protozoer ([b]), protein ([c])	BSN48, flingfoder	BSN en gång per dag Flingfoder två gånger per dag	När kläckningen är 90 %	2 dagar efter kläckningen
Oryzias latipes Medaka (japansk risfisk)	Flingfoder	BSN, flingfoder (eller protozoer eller hjuldjur)	BSN48, flingfoder (eller hjuldjur)	BSN en gång per dag, flingfoder två gånger per dag eller flingfoder och hjuldjur en gång per dag	Ej tillämpligt	6–7 dagar efter lek
Brack- och havsvatten:						
Cyprinodon variegatus Sheepshead minnow (art av tandkarp)	BSN, flingfoder, FBS	BSN	BSN48	2–3 utfodringar per dag	Ej tillämpligt	1 dag efter kläckning/uppsimning
Menidia sp. Silverlax	BSN48, flingfoder	BSN	BSN48	2–3 utfodringar per dag	Ej tillämpligt	1 dag efter kläckning/uppsimning

Teckenförklaring:

(*) Mat bör ges till mättnadstillstånd. Vid behov bör överbliven mat och avföring avlägsnas för att undvika ackumulering av avfall.FBS
frysta saltkräftor, vuxna *Artemia* sp.
BSN saltkräftor, nykläckta naupliuslarver
BSN48 saltkräftor, 48 timmar gamla naupliuslarver
([a]) yngel i gulesäcken behöver inget foder
([b]) filtreras från blandad kultur
([c]) granulat från jäsningsprocessen

02008R0440 — SV — 18.05.2017 — 007.001 — 2065

▼M7

Tillägg 4

NÅGRA KEMISKA EGENSKAPER FÖR GODTAGBART UTSPÄDNINGSVATTEN

Komponent	Koncentrationsgränsvärde
Partiklar	5 mg/l
Halt av organiskt kol	2 mg/l
Icke-joniserad ammoniak	1 µg/l
Resterande mängd klor	10 µg/l
Total mängd bekämpningsmedel som innehåller organiska fosforföreningar	< 50 ng/l
Total mängd bekämpningsmedel som innehåller organiska klorföreningar plus polyklorerade bifenyler	< 50 ng/l
Total mängd organiskt klor	< 25 ng/l
Aluminium	1 µg/l
Arsenik	1 µg/l
Krom	1 µg/l
Kobolt	1 µg/l
Koppar	1 µg/l
Järn	1 µg/l
Bly	1 µg/l
Nickel	1 µg/l
Zink	1 µg/l
Kadmium	< 100 ng/l
Kvicksilver	< 100 ng/l
Silver	< 100 ng/l

▼M7

Tillägg 5

STATISTISK VÄGLEDNING FÖR BESTÄMNING AV NOEC

Allmänt

Analysenheten är replikatkärlet. För kontinuerliga mätningar, såsom storlek, bör medel- eller medianvärdet för replikatet räknas ut och dessa replikatvärden utgör de data som ska analyseras. Styrkan hos det test som används bör påvisas, företrädesvis baserat på en lämplig historisk databas för varje laboratorium. Den storlekseffekt som kan upptäckas med 75–80 % styrka bör anges för varje endpoint med de statistiska test som ska användas.

De databaser som finns tillgängliga när testmetoden utvecklas avgör den styrka som är möjlig med de rekommenderade statistiska förfarandena. Enskilda laboratorier ska visa att de kan uppnå denna styrka genom att utföra egna styrkeanalyser eller genom att visa att variationskoefficienten (VC) för varje respons inte överstiger den 90:e percentilen för de variationskoefficienter som används för att utveckla testriktlinjen. Variationskoefficienterna anges i tabell 1. Om endast medel- eller medianvärden finns tillgängliga för replikatet kan variationskoefficienten inom replikatet ignoreras.

Tabell 1

Variationskoefficienter 90:e percentilen för utvalda sötvattensarter

Art	Respons	VC_mellan replikat	VC_inom replikat
Regnbåge	Längd	17,4	9,8
	Vikt	10,1	28
Knölskallelöja	Längd	16,9	13,5
	Vikt	11,7	38,7
Sebrafisk	Längd	43,7	11,7
	Vikt	11,9	32,8

För nästan alla statistiska tester som används för att utvärdera toxikologiska laboratorieundersökningar är det jämförelserna mellan behandlings- och kontrollgrupperna som är intressanta. Därför är det inte lämpligt att kräva ett signifikanstest enligt ANOVA F innan man använder Dunnetts eller Williams test eller kräva ett signifikanstest enligt Kruskal-Wallis innan man använder Jonckheere-Terpstra-, Mann-Whitney- eller Dunn-testet (Hochberg och Tamhane 1987, Hsu 1996, Dunnett 1955, 1964, Williams 1971, 1972, 1975, 1977, Robertson m.fl. 1988, Jonckheere 1954, Dunn 1964).

Dunnetts test har en inbyggd multiplicitetsjustering och dess falska positiva och negativa värden påverkas negativt om F-testet används som grindvakt. På samma sätt erhålls en negativ påverkan av Williams och Jonckheere-Terpstras tester av step-down-typ med användning av en signifikansnivå på 0,05 vid varje steg med bevarande av ett totalt falskt värde på 5 % samt det värdet och testets styrka om F-testet eller Kruskal-Wallis test används som grindvakt. Mann-Whitneys och Dunns tester måste justeras för multiplicitet, och här rekommenderas justeringen enligt Bonferroni-Holm.

En ingående diskussion av de flesta av rekommendationerna om hypotesprövning och verifiering av underliggande antaganden för dessa tester återfinns i OECD (2006), som även innehåller en omfattande litteraturförteckning.

▼M7

Behandling av kontroller när lösningsmedel används

Om lösningsmedel används bör både en kontroll av utspädningsvattnet och lösningsmedlet ingå i förfarandet. De två kontrollerna bör jämföras för varje respons och kombineras för statistisk analys om ingen signifikant skillnad påvisas mellan kontrollerna. I annat fall bör lösningsmedelskontrollen användas för NOEC-bestämningen eller skattningen av EC_x. Då används ingen vattenkontroll. Se begränsning av giltighetskriterier (punkt 7).

För längd, vikt, andelen kläckta ägg, dödlighet hos yngel eller onormala yngel samt första och sista dagen för kläckning eller uppsimning bör T-testet eller Mann-Whitneys test användas för att jämföra kontrollen av utspädningsvatten och av lösningsmedel vid en signifikansnivå på 0,05. I detta fall ignoreras alla behandlingsgrupper. Resultaten av dessa tester bör rapporteras.

Storleksmätningar (längd och vikt)

Individuella fiskars längd- och viktvärden kan ha en normal eller log-normalfördelning. I båda fallen brukar replikatens medelvärden vara normalt fördelade enligt den centrala gränsvärdessatsen och bekräftas av data från över 100 ELS-studier av tre sötvattensarter. Om data eller historiska databaser tyder på en log-normalfördelning för individuella fiskars storleksvärden kan medelvärdet av replikatets logaritmer för de individuella värdena beräknas och analysdata kan då vara antiloggar för dessa medelvärden av replikatets logaritmer.

Data bör utvärderas för överensstämmelse med en normalfördelning och variansens homogenitet. Residualer från ANOVA-modellen med koncentration som enda förklarande klassvariabel bör användas för detta ändamål. Visuell bestämning med hjälp av punktdiagram och histogram eller stam-blad-diagram kan användas. Alternativt kan ett formellt test som Shapiro-Wilk eller Anderson-Darling användas. Överensstämmelse med variansens homogenitet kan bedömas med hjälp av en visuell undersökning av samma punktdiagram eller formellt genom Levenes test. Endast parametriska tester (Williams, Dunnett) behöver utvärderas för normalitet eller variansens homogenitet.

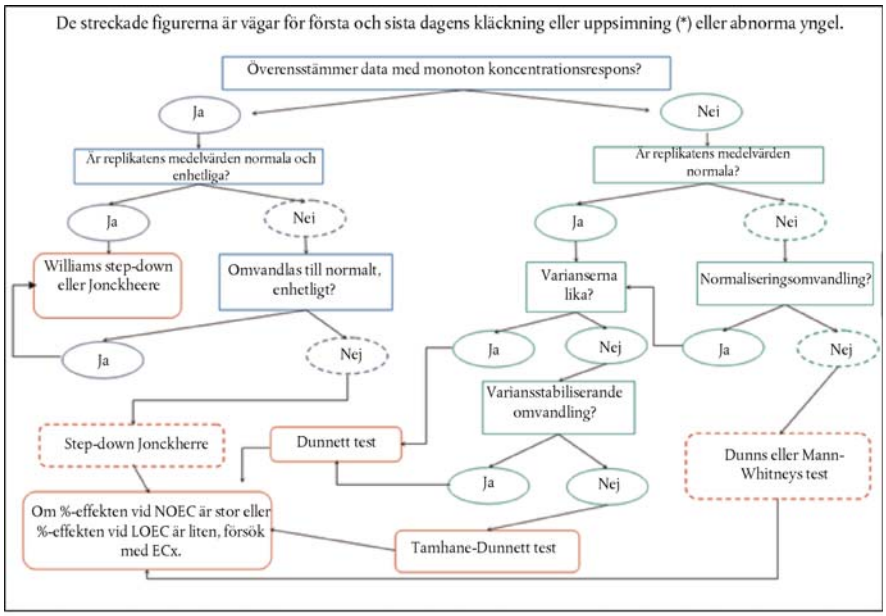
Eventuella avvikande värden och deras inverkan på analysen bör uppmärksammas. Tukeys test för avvikande värden samt visuell inspektion av samma residualdiagram som beskrivs ovan kan användas. Det är viktigt att tänka på att observationerna rör hela replikaten och avvikande värden bör därför utelämnas från analysen först efter noggrant övervägande.

De statistiska tester som använder inslag av experimentell design och biologiska förväntningar är trendtester av step-down-typ, som Williams och Jonckheere-Terpstra. Dessa tester förutsätter en monoton koncentrationsrespons och data bör bedömas för överensstämmelse med detta antagande. Detta kan ske visuellt genom ett punktdiagram för replikatets medelvärden mot testkoncentrationen. Det kan vara till hjälp att täcka punktdiagrammet med ett punktvis linjärt diagram som kopplar koncentrationens medelvärden viktade med samma provstorlek för replikatet. Om det punktvisa linjära diagrammet visar en kraftig avvikelse från monotonicitet är det eventuellt nödvändigt att använda icke-trendtester. Alternativt kan formella tester användas. Ett enkelt formellt test är att beräkna linjära och kvadratiska kontraster i koncentrationens medelvärden. Om den kvadratiska kontrasten är betydande och den linjära kontrasten är icke-betydande tyder detta på ett eventuellt problem med monotonicitet, som bör utvärderas ytterligare med hjälp av diagrammen. Om normaliteten eller variansens homogenitet är problematiska kan dessa kontraster konstrueras från transformerade rangordnade data. Alternativa förfaranden såsom Bartholomews test för monotonicitet kan användas, men då måste komplexitet läggas till.

▼M7

Figur 2

NOEC-flödesdiagram för storleksmätningar (längd och vikt)



(*) Dessa responser tillfredsställer aldrig antaganden från parametriska analyser eller modeller.

Om data inte överensstämmer med kraven för dessa tester bestäms NOEC genom ett Williams- eller Jonckheere-Terpstra-test av step-down-typ. Information om dessa förfaranden ges i OECD (2006). För data som inte överensstämmer med kraven för ett trendtest av step-down-typ kan Dunnetts eller Tamhane-Dunnetts (T3) test användas, eftersom båda testerna har inbyggda justeringar för multiplicitet. Dessa tester förutsätter normalitet och, när det gäller Dunnett, variansens homogenitet. Om dessa villkor inte är uppfyllda kan Dunns icke-parametriska test användas. OECD (2006) innehåller information om alla dessa tester. I figur 2 ges en översikt av hur man väljer test.

Kläckta ägg och överlevande yngel

Data är andelen kläckta ägg eller yngel som överlever i de individuella replikaten. Dessa andelar bör bedömas för extrabinomial varians, som är vanligt men inte generellt för sådana mätningar. Flödesschemat i figur 3 ger vägledning om hur man väljer test, se texten för detaljerade beskrivningar.

Två tester används ofta, nämligen Tarones C(α)-test (Tarone, 1979) och chi-två-test, varje test tillämpas separat för varje testkoncentration. Om extrabinomial varians påträffas i en testkoncentration bör metoder som omfattar detta användas.

Formel 1:

Tarones C (α)-test (Tarone 1979)

$$Z = \frac{\sum_{j=1}^{m} \frac{(x_j - n_j \hat{p})^2}{\hat{p}(1-\hat{p})} - \sum_{j=1}^{m} n_j}{\left\{ 2 \sum_{j=1}^{m} n_j (n_j - 1) \right\}^{1/2}}$$

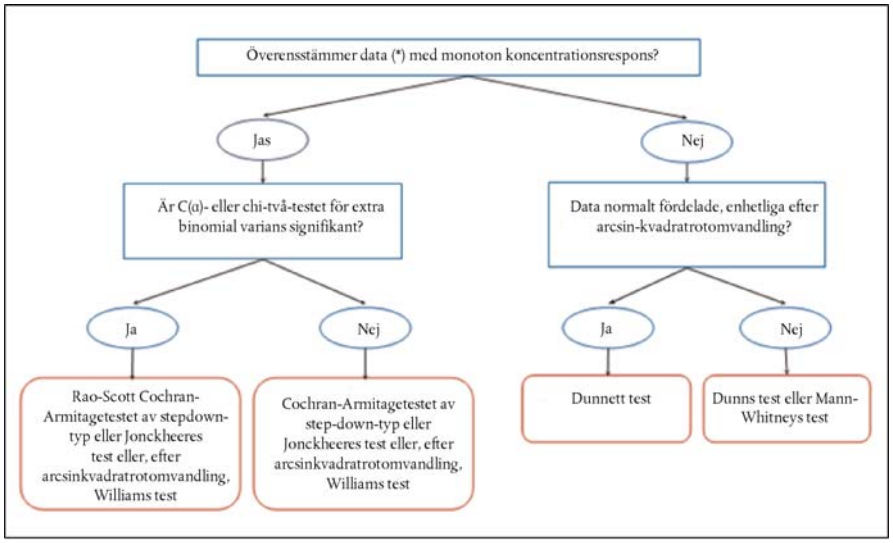
där $\hat{p}$ är den genomsnittliga andelen för en given koncentration, **m** är antalet replikatkärl $\mathbf{n_j}$ är antalet ämnen i replikat **j**, och $\mathbf{x_j}$ är antalet djur i replikatet som svarar, t.ex. ej kläckta djur eller döda djur. Detta test ska tillämpas separat

▼M7

på varje koncentration. Testet kan betraktas som ett justerat chi-två-test, men begränsade kraftsimulationer som har utförts av Tarone har visat att det är mer kraftfullt än ett chi-två-test.

Figur 3

NOEC-flödesschema för kläckta ägg och dödlighet hos yngel



(*) Uppgifterna motsvarar replikatets andel.

Om det inte finns några tydliga tecken på extrabinomial varians kan ett Cochran-Armitage-test av step-down-typ användas. Detta test ignorerar replikaten, så när det finns sådana belägg beaktar Rao-Scott-justeringen av Cochran-Armitages test (RSCA) replikaten, replikatens storlekar och den extrabinomiala variansen, och rekommenderas därför. Alternativa tester är Williams- och Jonckheere-Terpstra-tester av step-down-typ och Dunnetts test, enligt beskrivningen av storleksmätningar. Dessa tester är tillämpliga vare sig extrabinomial varians förekommer eller ej, men har något mindre kraft (Agresti 2002, Morgan 1992, Rao och Scott 1992, 1999, Fung m.fl. (1994, 1996).

Första eller sista dagen för kläckning eller uppsimning

Responsen är ett heltal, som anger den testdag då den angivna observationen iakttas för ett visst replikatkärl. Urvalet av värden är i regel mycket begränsat och det förekommer ofta en hög andel bundna värden, t.ex. att samma första kläckningsdag observeras i alla kontrollreplikat och kanske i en eller två låga testkoncentrationer. Parametriska tester såsom Williams och Dunnett är inte lämpliga för sådana data. Om det inte finns bevis på allvarlig icke-monotonicitet är ett Jonckheere-Terpstra-test av step-down-typ mycket kraftfullt för att upptäcka effekter av testkemikalien. Annars kan Dunns test användas.

Abnormiteter hos yngel

Responsen är antalet yngel som befunnits vara onormala på något sätt. Denna respons har ofta låg incidens och kan uppvisa samma problem som första kläckningsdatumet. Oregelbunden koncentrationsrespons kan också förekomma. Om data åtminstone grovt liknar en monoton koncentrationsform är ett Jonckheere-Terpstra-test av step-down typ kraftfullt för att upptäcka effekter. Annars kan Dunns test användas.

▼M7

LITTERATURHÄNVISNINGAR

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, KY, 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. och 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. nr 54. Organisationen för ekonomiskt samarbete och utveckling (OECD), Paris.

Rao J.N.K. och Scott A.J. (1992) – A simple method for the analysis of clustered binary data, Biometrics 48, 577–585.

Rao J.N.K. och 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. och 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

Tillägg 6

STATISTISK VÄGLEDNING FÖR REGRESSIONUPPSKATTNINGAR

Allmänt

De observationer som används för att anpassa modellen är replikatets medelvärden (längd och vikt) eller replikatets proportioner (kläckta ägg och dödlighet hos yngel) (OECD 2006).

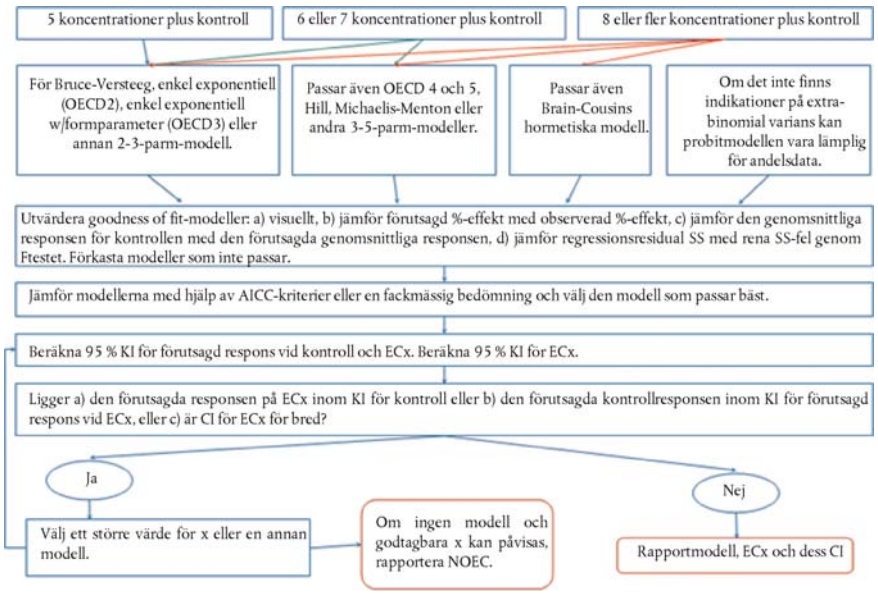
Viktad regression med användning av replikatets urvalsstorlek som vikt rekommenderas allmänt. Andra viktningssystem är dock möjliga, såsom viktning genom förutsagd genomsnittlig respons eller en kombination av detta och replikatets urvalsstorlek. Viktning genom ömsesidig urvalsvarians inom koncentrationen rekommenderas inte (Bunke m.fl. 1999, Seber och Wild, 2003, Motulsky och Christopoulos 2004, Huet m.fl. 2003).

Oberoende observationer bör bevaras vid eventuell transformation av responser före analys, och EC_x och dess konfidensgränser bör uttryckas i de ursprungliga mätenheterna, inte i transformerade enheter. En förändring på 20 % i logaritmen för längd motsvarar t.ex. inte en förändring på 20 % i längd (Lyles m.fl. 2008, Draper och Smith 1999).

Flödesdiagrammet i figur 4 ger en översikt av EC_x-uppskattningar. Detaljerna beskrivs i texten nedan.

Figur 4

Flödesschema för EC_x-uppskattning av replikatets genomsnittliga längd, vikt eller andelen kläckta ägg eller dödlighet hos yngel, se texten för mer information



Överväganden rörande antalet kläckta ägg och dödlighet hos yngel

För kläckta ägg och dödlighet hos yngel är det i regel bäst att anpassa en minskande modell om man inte anpassar en probitmodell såsom beskrivs nedan. Det innebär att man bör modellera andelen ägg som inte kläcks eller andelen döda yngel. Anledningen till detta är att ECx avser en koncentration vid vilken det finns en förändring som motsvarar x % av kontrollens responsmedelvärde. Om 5 % av kontrolläggen inte kläcks och man modellerar antalet misslyckade kläckningar, avser EC20 en koncentration vid vilken det sker en förändring som motsvarar 20 % ej kläckta ägg och 5 % kläckta ägg i kontrollen, vilket i sin tur motsvarar en förändring på 0,2 × 0,05 = 0,01 eller 1 procentenhet mot 6 % ej kläckta ägg. En sådan liten förändring kan inte beräknas på något meningsfullt

▼M7

sätt från tillgängliga data och är inte biologiskt viktig. Om man däremot modellerar andelen kläckta ägg skulle kontrollandelen i detta exempel motsvara 95 % och en minskning på 20 % av kontrollmedelvärdet skulle motsvara en förändring på 0,95 × 0,2 = 0,18, dvs. 95 % kläckta ägg till 77 % (= 95-18) kläckta ägg. Denna effektkoncentration kan uppskattas och är förmodligen av större intresse. Detta problem förekommer inte i storleksmätningar, men negativa effekter på storleken innebär i regel minskad storlek.

Modeller för storlek (längd eller vikt) och kläckta ägg eller överlevande yngel.

Med undantag för Brain-Cousins hormetiska modell beskrivs och rekommenderas alla dessa modeller i OECD (2006). Den så kallade OECD 2-5 diskuteras också i samband med ekotoxicitetsförsök i Slob (2002). Det finns naturligtvis många andra modeller som kan vara användbara. Bunke, m.fl. (1999) anger ett antal modeller som inte ingår här och det finns många hänvisningar till andra modeller. De metoder som anges nedan anses vara särskilt lämpliga för ekotoxicitetsförsök och är allmänt vedertagna.

Metod med fem testkoncentrationer plus kontroll.

— Bruce-Versteeg.

— Enkel exponentiell metod (OECD 2).

— Exponentiell metod med formparameter (OECD 3).

— Enkel exponentiell metod med nedre gräns (OECD 4).

Metod med sex eller fler testkoncentrationer plus kontroll.

— Exponentiell metod med formparameter och nedre gräns (OECD 5).

— Michaelis-Menton.

— Hill.

Om det finns synliga tecken på hormesis (osannolikt vad gäller kläckningsframgång och yngelöverlevnad, men förekommer ibland i storleksobservationer).

— Brain-Cousins Hormetic, Brain and Cousens (1989).

Alternativa modeller för misslyckade kläckningar och dödlighet hos yngel

— Ökande modeller för dessa responser kan anpassas med hjälp av probitmodeller (eller logistiska modeller) om det inte finns några belägg för extrabinomial varians och kontrollincidensen uppskattas i modellanpassningen. Denna metod är dock inte att föredra eftersom den behandlar individen, inte replikaten, som analysenheter (Morgan 1992, O'Hara Hines och Lawless 1993, Collett 2002, 2003).

Anpassningsgraden (”goodness of fit”) för en enskild modell

— Gör en visuell jämförelse av observerade och förutsagda procentuella minskningar för varje testkoncentration (Motulsky och Christopoulos 2004, Draper och Smith 1999).

— Jämför regressionens medelkvadratsumma och den rena medelkvadratsumman genom användning av F-test (Draper och Smith 1999).

— Kontrollera att varje term i modellen avviker nämnvärt från 0 (fastställ om alla modelltermer är viktiga) (Motulsky och Christopoulos 2004).

▼M7

— Residualdiagram från regressionen mot testkoncentrationen, möjligen enligt en log(konc.)skala. Diagrammet bör inte ha något mönster, utan punkterna bör vara slumpmässigt utspridda längs en horisontell linje vid nollhöjd.

— Uppgifterna bör utvärderas för normalitet och variansens homogenitet på samma sätt som anges i tillägg 5.

— Dessutom bör residualernas normalitet i regressionsmodellen bedömas med hjälp av samma metoder som anges i tillägg 5 för residualer från ANOVA.

Jämför modellerna.

— Använd Akiakes AICC-kriterier. Mindre AICC värden anger bättre anpassningar. Om AICc(B)-AICc(A)≥10 är modell A nästan säkert bättre än modell B (Motulsky och Christopoulos (2004).

— Jämför de två modellerna visuellt genom att titta på hur väl de uppfyller det enskilda modellkriteriet ovan.

— Sparsamhetsprincipen rekommenderas, vilket innebär att den enklaste modellen som passar uppgifterna rimligt väl används (Ratkowsky 1993, m.fl. Lyles 2008).

EC_x-skattningens kvalitet

Konfidensintervallet (KI) för EC_x bör inte vara för brett. Det krävs en statistisk bedömning för att avgöra hur stort konfidensintervallet får vara för att ECx fortfarande ska vara användbart. Simuleringar för regressionsmodeller som är anpassade till antal kläckta ägg och storleksdata visar att ett konfidensintervall på cirka 75 % för EC_x (X = 10, 20 eller 30) inte sträcker sig över fler än två testkoncentrationer. Detta ger allmän vägledning om vad som är acceptabelt och praktiska råd om vad som är möjligt. Ett flertal författare hävdar att det är nödvändigt att rapportera konfidensintervall för alla modellparametrar och att breda konfidensintervall för modellparametrar tyder på att modellen är oacceptabel (Ott och Longnecker 2008, Alvord och Rossio 1993 Motulsky och Christopoulos 2004, Lyles m.fl. 2008, Seber och Wild 2003, Bunke m.fl. 1999, Environment Canada 2005).

KI för EC_x (eller någon annan modellparameter) får inte innehålla noll (Motulsky och Christopoulos 2004). Detta är motsvarigheten i regressionsmodeller till den minsta signifikanta skillnad som ofta citeras i hypotestestmetoder (t.ex. Wang m.fl. 2000). Det motsvarar också konfidensintervallet för de genomsnittliga LO-EC-responser som inte innehåller kontrollmedelvärdet. Man bör fråga sig om parameterskattningarna är vetenskapligt trovärdiga. Om konfidensintervallet för y0 är ± 20 % är t.ex. ingen EC_{10}-skattning rimlig. Om modellen förutsäger en effekt på 20 % vid koncentration C och den maximala observerade effekten vid C och lägre koncentrationer är 10 %, är EC_{20} inte rimlig (Motulsky och Christopoulos 2004, Wang m.fl. 2000, Environment Canada 2005).

EC_x bör inte kräva extrapolering utanför positiva koncentrationer (Draper och Smith 1999, OECD 2006). En allmän vägledning kan t.ex. vara att EC_x inte är mer än omkring 25 % lägre än den lägsta testade koncentrationen eller över den högsta testade koncentrationen.

LITTERATURHÄNVISNINGAR

Alvord, W.G., Rossio, J.L. (1993), Determining confidence limits for drug potency in immunoassay, Journal of Immunological Methods 157, 155–163.

Brain, P. och 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. och Polzehl, J. (1999). Model selection, transformations and variance estimation in nonlinear regression. *Statistics* 33, 197–240.

Collett, D. (2002), Modelling Binary Data, andra upplagan, Chapman and Hall, London.

Collett, D. (2003), Modelling Survival Data in Medical Research, andra upplagan, Chapman and Hall, London.

Draper, N. R. och Smith, H. (1999), Applied Regression Analysis, tredje upplagan. 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, och C.R. Cooper (2008), Nonlinear Model-Based Estimates of IC50 for Studies Involving Continuous Therapeutic Dose-Response Data, *Contemp Clin Trials*. 29 november 2008, 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. och J. F. Lawless (1993), Modelling Overdispersion in Toxicological Mortality Data Grouped over Time, *Biometrics* Vol. 49, s. 107–121

OECD (2006), Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: A guidance to application. Series Testing and Assessment, nr 54, Organisation for Economic Co-operation and Development, OECD, Paris.

Ott, R.L., M.T. Longnecker, An Introduction to Statistical Methods and Data Analysis, sjätte upplagan, 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, och 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, s. 113–117, 2000.

▼M7

C.48 KORTTIDSTEST AV REPRODUKTION HOS FISK

INLEDNING

1. Denna testmetod motsvarar OECD:s testriktlinje (TG) 229 (2012). Behovet av att utveckla och validera ett test på fisk som kan påvisa endokrint aktiva kemikalier härrör från farhågor att koncentrationen av kemikalier i miljön kan orsaka negativa effekter både hos människor och vilda djur på grund av samspelet mellan dessa kemikalier och det endokrina systemet. OECD inledde 1998 en högprioriterad verksamhet för att se över befintliga riktlinjer och utveckla nya riktlinjer för undersökning och testning av potentiellt endokrinstörande ämnen. Ett inslag i verksamheten var att utveckla en testmetod för undersökning av kemikalier som är verksamma på det endokrina systemet hos fiskarter. Det kortvariga reproduktionstestet på fisk genomgick ett omfattande valideringsprogram bestående av interlaborativa studier med utvalda kemikalier för att demonstrera testets relevans och tillförlitlighet för påvisning av kemikalier som påverkar reproduktionen hos fisk genom flera olika mekanismer, inklusive endokrina modaliteter (1, 2, 3, 4, 5). Alla endpoints i OECD:s testriktlinje har validerats för knölskallelöja, och en underordnad uppsättning endpoints har validerats för medaka (japansk risfisk) (dvs. vitellogenin och sekundära könskaraktärer) samt för sebrafisk (dvs vitellogenin). Valideringsarbetet har granskats av en expertpanel utsedd av de nationella samordnarna för OECD:s testmetodprogram (Test Guideline Programme) (6) och dels av en oberoende expertpanel på uppdrag av Förena staternas Environmental Protection Agency (29). Testet är inte utformat för att upptäcka särskilda hormonstörande mekanismer eftersom försöksdjuren har en intakt hypotalamus-hypofys-gonad-axel (HPG-axel), som kan reagera på kemikalier som påverkar HPG-axeln på olika nivåer.

2. Denna metod beskriver ett screeningtest in vivo där könsmogna lekande hanar och honor hålls tillsammans och exponeras för en kemikalie under en begränsad del av deras livscykel (21 dagar). Vid slutet av den 21 dagar långa exponeringstiden mäts en eller två biomarkörer som endpoints hos hanar och honor som indikatorer på testkemikaliens endokrina aktivitet. Dessa endpoints är vitellogenin och sekundära könskaraktärer. Vitellogenin mäts hos knölskallelöja, medaka och sebrafisk, medan de sekundära könskaraktärerna mäts hos knölskallelöja och medaka. Dessutom övervakas kvantitativ fruktsamhet (fekunditet) dagligen under hela testet. Könskörtlar bevaras också och histopatologi kan utvärderas för att bedöma försöksdjurens reproduktiva lämplighet och komplettera den sammanvägda bedömningen av andra endpoints.

3. Denna bioanalys tjänar som en reproduktiv in vivo-screeninganalys och dess tillämpning bör ses mot bakgrund av OECD:s konceptuella ramverk för testning och bedömning av endokrinstörande kemikalier (30). I denna begreppsram föreslås det kortvariga reproduktionstestet på fisk på nivå 3 som en in vivo-analys som ger data om valda endokrina mekanismer eller vägar.

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN OCH BEGRÄNSNINGAR

4. Vitellogenin (VTG) produceras vanligen i levern hos honor av äggläggande ryggradsdjur som respons på cirkulerande endogent östrogen. Det är en prekursor till ägguleproteiner, och när det väl har producerats i levern förs det med blodet till äggstockarna, där det tas upp och modifieras av ägg som är under utveckling. Vitellogenin är nästan inte påvisbart i plasman hos icke könsmogna hon- och hanfiskar eftersom de saknar tillräckliga halter av cirkulerande östrogen. Levern kan dock bilda och utsöndra vitellogenin som respons på exogen östrogenstimulans.

▼M7

5. Mätningen av vitellogenin tjänar till att påvisa kemikalier med olika östrogena verkningsmekanismer. Man kan påvisa ämnen med östrogena kemikalier genom mätning av vitellogenininduktionen hos hanfiskar, och detta har dokumenterats många gånger i den fackgranskade vetenskapliga litteraturen (t.ex. (7)). Vitellogenininduktion har också påvisats efter exponering för aromatiserbara androgener (8, 9). En minskning av nivåerna av cirkulerande östrogen hos honor, till exempel genom hämning av aromatasen som omvandlar det endogena androgenet till det naturliga östrogenet 17-beta-östradiol, orsakar en minskning av VTG-koncentrationen, som används för att påvisa kemikalier med aromatashämmande egenskaper (10, 11). Den biologiska relevansen av den vitellogeninrespons som följer östrogen hämning och aromatashämning har fastställts och har dokumenterats i stora drag. Det är dock möjligt att produktionen av VTG hos honor även kan påverkas av allmän toxicitet och icke-endokrina toxiska verkningsmekanismer, t.ex. hepatotoxicitet.

6. Flera mätmetoder har framgångsrikt utvecklats och standardiserats för rutinmässig användning. Detta gäller artspecifika testmetoder för ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) som använder immunokemiska tekniker för kvantifiering av det VTG som producerats i små blod- eller leverprover som insamlats från enskilda fiskar (12, 13, 14, 15, 16, 17, 18). Prov tas på blod från knölskallelöja, blod eller huvud/stjärthomogenat från sebrafisk och lever från medaka för mätning av VTG. Hos medaka finns det en god korrelation mellan VTG mätt i blod och i leverprover (19). Tillägg 6 innehåller de rekommenderade förfarandena för provtagning för analys av VTG. Utrustning för mätning av VTG är lätt att få tag på. Denna utrustning bör bygga på en validerad artspecifik ELISA-metod.

7. De sekundära könskaraktärerna hos hanarna av vissa fiskarter är externt synliga, kvantifierbara och mottagliga för cirkulerande nivåer av endogena androgener. Detta är fallet för knölskallelöja och medaka, men inte för sebrafisk, som inte har några kvantifierbara sekundära könskaraktärer. Honor behåller förmågan att utveckla sekundära hanliga könskaraktärer om de exponeras för androgena kemikalier i vattnet. Flera studier finns tillgängliga i den vetenskapliga litteraturen som dokumenterar denna typ av respons hos knölskallelöja (20) och medaka (21). En minskning av de sekundära könskaraktärerna hos hanar bör tolkas med försiktighet på grund av dålig statistisk giltighet, och bör i stället bygga på en expertbedömning och på vikten av de sammanlagda bevisen. Det finns begränsningar för användningen av sebrafisk i detta test, eftersom dessa fiskar inte har några kvantifierbara sekundära könskaraktärer som är mottagliga för androgena kemikalier.

8. Hos knölskallelöja är den viktigaste indikatorn på exogen exponering för androgener antalet parningstuberkler på honornas nosar. Hos medaka utgör antalet papillära utväxter det huvudsakliga kännetecknet hos honor för exogen exponering för androgena kemikalier. I tilläggen 5A och 5B anges rekommenderade förfaranden som man bör följa när man utvärderar könskaraktärerna hos knölskallelöja och medaka.

9. Det 21 dagar långa fisktestet omfattar utvärdering av kvantitativ äggproduktion och bevarande av könskörtlar för valfri histopatologisk undersökning. Vissa tillsynsmyndigheter kan kräva denna ytterligare endpoint för en mer komplett utvärdering av testdjurens reproduktiva lämplighet, eller i fall där vitellogenin och sekundära könskaraktärer inte reagerat för kemisk exponering. Vissa endpoints kan vara mycket diagnostiska (t.ex. VTG-induktion hos hanar och knölbildning hos honor), men inte alla endpoints (t.ex. fruktsamhet och könskörtlarnas histopatologi) i testet är avsedda att entydigt identifiera specifika cellulära verkningsmekanismer. Det är snarare uppsättningen endpoints i stort som gör det möjligt att dra slutsatser om eventuella endokrina störningar, och därmed ge vägledning för vidare testning. Fruktsamhet är inte

▼M7

är endokrinspecifikt, men är bevisat känsligt för kända endokrinaktiva kemikalier (5) och är därför en viktig endpoint att inkludera. Om fruktsamhet och andra endpoints inte påverkas kan man nämligen vara mer säker på att en sammansättning sannolikt inte är endokrinaktiv. Om fruktsamheten påverkas kommer denna endpoint emellertid att bidra starkt till interferenser i vikten av de sammanlagda bevisen. Närmare vägledning om tolkning av data och acceptans av testresultat ges i testmetoden.

10. Definitioner som används i denna testmetod finns i tillägg 1.

TESTPRINCIP

11. Med denna metod exponeras han- och honfiskar som är i ett reproduktivt stadium tillsammans i testkärlen. Deras status som vuxna djur i reproduktivt stadium gör att könen är tydligt särskiljbara och att de är mottagliga för exogena kemikalier, och därmed kan man göra en könsrelaterad analys av varje endpoint. Vid slutet av testet bekräftas könet med hjälp av makroskopisk undersökning av könskörtlarna efter att buken öppnats ventralt med sax. En översikt över de relevanta betingelserna för ett biologiskt test återfinns i tillägg 2. Testet inleds normalt med fisk som tagits från en population som befinner sig i lekstadium. Äldre djur bör inte användas. Vägledning om fiskarnas ålder och reproduktiva status finns i avsnittet om urval av fisk. Testet genomförs med tre kemiska exponeringskoncentrationer och en vattenkontroll, och vid behov en lösningsmedelskontroll. Två kärl eller replikat per behandling används för sebrafisk (varje kärl innehåller fem hanar och fem honor), medan fyra kärl eller replikat per behandling används för knölskallelöja (varje kärl innehåller två hanar och fyra honor). Detta är för att tillgodose knölskallelöjhanens territoriella beteende samtidigt som testets giltighet upprätthålls. Fyra kärl eller replikat per behandling används för medaka (varje kärl innehåller 3 hanar och 3 honor). Exponeringens varaktighet är 21 dagar, och provtagningen på fiskarna sker på dag 21 av exponeringen. Kvantitativ fruktsamhet övervakas dagligen.

12. Vid provtagningen på dag 21 avlivas alla djuren på ett humant sätt. De sekundära könskaraktärerna mäts hos knölskallelöja och medaka (se tillägg 5A och 5B), blodprov tas för bestämning av VTG i sebrafisk och knölskallelöja eller huvud/stjärt samlas in för bestämning av VTG i sebrafisk (tillägg 6), och levern samlas in för VTG-analys av medaka (tillägg 6). Könskörtlarna fixeras antingen hela eller dissekeras för eventuell histopatologisk bedömning (22).

KRITERIER FÖR GODKÄNNANDE AV TESTET

13. För att testresultaten ska kunna godtas måste följande villkor uppfyllas:

— Dödligheten i vatten- eller lösningsmedelskontrollen bör inte överstiga 10 % i slutet av exponeringsperioden.

— Koncentrationen löst syre bör vara minst 60 % av luftmättnadsvärdet (ASV) under hela exponeringsperioden.

— Vattentemperaturen bör inte vid någon tidpunkt under exponeringsperioden variera med mer än ± 1,5 °C mellan olika testkärl, och får variera med högst 2 °C från de temperaturgränser som specificerats för den art som används i testet (se tillägg 2).

— Bevis bör finnas tillgängliga som visar att koncentrationen av testkemikalien i lösningen på ett tillfredsställande sätt har hållits inom ± 20 % av de genomsnittliga uppmätta värdena.

▼M7

— Bevis för att fisken aktivt leker i alla replikat innan den kemiska exponeringen inleds och i kontrollreplikaten under testet.

BESKRIVNING AV TESTMETODEN

Utrustning

14. Normal laboratorieutrustning, och särskilt följande:

a. syrgas- och pH-mätare,

b. utrustning för bestämning av vattnets hårdhet och alkalinitet,

c. lämplig utrustning för temperaturreglering, helst med kontinuerlig övervakning,

d. akvarier tillverkade av kemiskt inert material och tillräckligt stora för den rekommenderade fisk- och antalstätheten (se tillägg 2),

e. leksubstrat för knölskallelöja och sebrafisk (tillägg 4 innehåller de uppgifter som behövs),

f. lämplig precisionsvåg (t.ex. noggrannhet ± 0,5 mg).

Vatten

15. Allt vatten i vilket testarten uppvisar lämplig överlevnad och tillväxt kan användas som testvatten. Vattnet ska hålla jämn kvalitet under hela testperioden. Vattnets pH bör ligga inom intervallet 6,5–8,5 men får dock under ett givet test variera med högst ± 0,5 pH-enheter. För att säkerställa att utspädningsvattnet inte påverkar testresultaten på oönskat sätt (t.ex. genom komplexbildning med testkemikalien) bör vattenprover tas regelbundet för analys. Mätningar av tungmetaller (t.ex. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd och Ni), viktiga anjoner och katjoner (t.ex. Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-} och SO_4^{2-}), bekämpningsmedel (t.ex. total mängd organiska fosforföreningar eller total mängd organiska klorföreningar), halten organiskt kol och uppslammade partiklar bör göras t.ex. var tredje månad i fall där man vet att utspädningsvattnet håller en relativt jämn kvalitet. Om vattenkvaliteten har visat sig vara jämn under minst ett år kan dessa kontroller göras med längre intervaller (t.ex. var sjätte månad). Några kemiska egenskaper för godtagbart utspädningsvatten anges i tillägg 3.

Testlösningar

16. Testlösningar med de valda koncentrationerna bereds genom utspädning av en stamlösning. Stamlösningen bör helst beredas genom att man helt enkelt blandar eller skakar testkemikalien i utspädningsvattnet på mekanisk väg (t.ex. omrörning eller ultraljud). Mättnadskolonner (löslighetskolonner) kan användas för att få en stamlösning med lämplig koncentration. Användning av lösningsmedel som bärämne rekommenderas inte. Om ett lösningsmedel måste användas kan man dock inrätta en lösningsmedelskontroll som testas parallellt med samma lösningsmedelskoncentration som i de kemiska behandlingarna. För kemikalier som är svåra att testa kan lösningsmedel tekniskt sett vara den bästa lösningen. OECD:s vägledningsdokument om akvatisk toxicitetstestning av svåra ämnen och blandningar bör konsulteras i sådana fall (23). Valet av lösningsmedel avgörs av testkemikaliens eller blandningens kemiska egenskaper. OECD:s vägledningsdokument rekommenderar högst 100 µl/l, en rekommendation som bör iakttas. En färsk undersökning (24) visade dock på ytterligare problem vid användning av lösningsmedel när man testar för endokrin aktivitet. Det rekommenderas därför att koncentrationen av ett eventuellt lösningsmedel begränsas till ett minimum om det är tekniskt genomförbart (beroende på testkemikaliens fysikalisk-kemiska egenskaper).

▼M7

17. Ett genomflödestestsystem ska användas. Ett sådant system portionerar och späder kontinuerligt ut en stamlösning av testkemikalien (t. ex. med mätpump, proportionalitetslösningssystem och mättnadskärlsystem) för att tillföra en serie koncentrationer till testbehållarna. Stamlösningens och utspädningsvattnets flödeshastighet bör kontrolleras regelbundet under testets gång, helst dagligen, och får inte variera med mer än 10 % under hela testet. Man bör vara noga med att undvika att använda plaströr av låg kvalitet eller andra material som kan innehålla biologiskt aktiva kemikalier. Vid val av materialet för genomflödessystemet bör man beakta möjligheten att testkemikalien eventuellt kan adsorberas till detta material.

Fiskhållning

18. Testfiskarna ska tas från en laboratoriepopulation från en enda stam som under minst två veckor före testets början har acklimatiserats för testet genom att hållas i vatten med samma kvalitet och ljusförhållanden som det som används i testet. Det är viktigt att fisk- och antalstätheten (för definitioner, se tillägg 1) anpassas för de arter som testas (se tillägg 2).

19. Efter en anpassningsperiod på 48 timmar ska dödligheten registreras och följande kriterier tillämpas:

— Om mortaliteten under sju dagar är högre än 10 % av beståndet bör hela beståndet förkastas.

— Om mortaliteten ligger mellan 5 % och 10 % av beståndet fortsätts acklimatiseringen under ytterligare sju dagar. Om mer än 5 % av beståndet har dött under den andra sjudagarsperioden ska hela beståndet förkastas.

— Om mortaliteten under sju dagar är lägre än 5 % av beståndet kan beståndet godtas.

20. Fiskarna bör inte ges någon behandling mot sjukdomar under acklimatiseringsperioden, under förexponeringen, eller under exponeringsperioden.

Förexponering och urval av fisk

21. En förexponeringsperiod på en till två veckor rekommenderas då djuren placeras i kärl som liknar de som används i det verkliga testet. Fiskarna bör utfodras ad libitum under hela djurhållningsperioden och under exponeringsfasen. Exponeringen inleds med sexuellt dimorf vuxen fisk från en laboratoriesamling med könsmogna djur (t.ex. med tydligt synbara sekundära könskaraktärer när det gäller knölskallelöja och medaka) som aktivt leker. För allmän vägledning (detta bör inte betraktas isolerat från observationer av ett fiskbestånds faktiska reproduktiva status), bör knölskallelöjorna vara ungefär 20 (± 2) veckor gamla, förutsatt att de har odlats vid en temperatur på 25 ± 2 °C under hela sin livstid. Medaka bör vara ungefär 16 (± 2) veckor, förutsatt att de har odlats vid en temperatur på 25 ±2 °C under hela sin livstid. Sebrafiskar bör vara ungefär 16 (± 2) veckor, förutsatt att de har odlats vid en temperatur på 26 ± 2 °C under hela sin livstid. Äggproduktionen bör utvärderas dagligen under förexponeringsfasen. Det rekommenderas att lek observeras i alla replikatkärl innan de tas med i testets exponeringsfas. Det är inte möjligt att ge kvantitativ vägledning om önskvärd daglig äggproduktion i detta skede, men det är relativt vanligt att observera genomsnittlig lek på > 10 ägg/hona/dag för varje art. En randomiserad blockutformning baserad på äggproduktionen bör användas för att fördela replikaten till de olika testnivåerna. Syftet är att säkerställa en balanserad fördelning av replikaten.

▼M7

TESTETS UTFORMNING

22. Tre koncentrationer av testkemikalien, en kontroll (vatten) och, vid behov, en lösningsmedelskontroll används. Uppgifterna kan analyseras för att fastställa statistiskt signifikanta skillnader mellan responsen i behandlingarna och i kontrollen. Dessa analyser kommer att klargöra huruvida ytterligare testning av mer långsiktiga negativa effekter (dvs. överlevnad, utveckling, tillväxt och reproduktion) krävs för kemikalien, snarare än att de används för riskbedömning (25).

23. För sebrafisk undersöks på dag 21 av försöket hanar och honor från varje behandlingsnivå (fem hanar och fem honor i vart och ett av de två replikaten) och från kontrollen eller kontrollerna för mätning av vitellogenin. För medaka undersöks på dag 21 av försöket hanar och honor från varje behandlingsnivå (tre hanar och tre honor i var och en av de fyra replikaten) och från kontrollen eller kontrollerna för mätning av vitellogenin och sekundära könskaraktärer. För knölskallelöja undersöks på dag 21 av exponeringen hanar och honor (två hanar och fyra honor i vart och ett av de fyra replikaten) och från kontrollen eller kontrollerna för mätning av vitellogenin och sekundära könskaraktärer. En kvantitativ bedömning av fruktsamheten krävs, och könskörtelvävnaderna bör fixeras hela eller dissekerade för eventuell histopatologisk utvärdering, om så är nödvändigt.

Val av testkoncentrationer

24. Vid utförandet av detta prov bör den högsta testkoncentrationen fastställas utifrån den högsta tolererade koncentrationen (MTC), vilken bestäms på grundval av ett preliminärt test eller andra uppgifter om toxicitet, eller 10 mg/l, eller högsta löslighet i vatten, beroende på vilket som är lägst. MTC definieras som den högsta testade koncentrationen av testkemikalien som leder till mindre än 10 % dödlighet. Denna metod förutsätter att det finns empiriska uppgifter om akut toxicitet eller toxikologiska uppgifter utifrån vilka MTC kan uppskattas. Uppskattningar av MTC-koncentrationen kan vara otillförlitliga och kräver vanligen ett visst mått av fackmässigt omdöme.

25. För detta krävs tre testkoncentrationer som skiljer sig åt med en konstant faktor som inte överstiger 10 och en kontroll med utspädningsvatten (och en lösningsmedelskontroll vid behov). Ett intervall för spridningsfaktorer på mellan 3,2 och 10 rekommenderas.

FÖRFARANDE

Val och vägning av testfiskarna

26. Det är viktigt att minimera fiskarnas variationer i vikt vid början av testet. I tillägg 2 anges lämpliga storleksintervaller för de arter som rekommenderas för användning i detta test. För hela det fiskbestånd som används i testet bör variationen mellan individernas vikt för hanar och honor vid testets början om möjligt hållas inom ± 20 % av den aritmetiska medelvikten för samma kön. Det rekommenderas att ett delprov av fiskbeståndet vägs före testet i syfte att uppskatta medelvikten.

Exponeringsförhållanden

Löptid

27. Testperiodens längd är 21 dagar efter en förexponeringsperiod. Den rekommenderade förexponeringsperioden är en till två veckor.

Utfodring

28. Fiskarna bör utfodras ad libitum med lämpligt foder (tillägg 2) i tillräcklig mängd för att upprätthålla kroppskonditionen. Det är viktigt att se till att det inte uppstår mikrobtillväxt eller att vattnet blir grumligt. Som en allmän vägledning kan sägas att den dagliga fodergivan kan delas upp i två eller

▼M7

tre lika stora delar för flera utfodringstillfällen per dag, med minst tre timmar mellan varje utfodring. En enda större giva kan godtas, särskilt under veckosluten. Fiskarna ska inte ges något foder under de tolv timmar som föregår provtagningen/obduktionen.

29. Fiskfodret bör utvärderas med avseende på förekomst av föroreningar såsom bekämpningsmedel som innehåller organiska klorföreningar, polycykliska aromatiska kolväten (PAH) och polyklorerade bifenyler (PCB). Man bör undvika att ge foder som har en hög nivå av fytoöstrogener som kan äventyra testresponsen för kända östrogenagonister (t.ex. 17b-östradiol).

30. Oätet foder och fekalt material ska avlägsnas från testkärlen minst två gånger i veckan, t.ex. genom omsorgsfull rengöring av akvariets botten med hjälp av en hävert.

Ljus och temperatur

31. Fotoperioden och vattentemperaturen bör vara anpassade för den art som testas (se tillägg 2).

Frekvens för analytiska bestämningar och mätningar

32. Innan exponeringstiden inleds bör man se till att det kemiska tillsatssystemet fungerar på lämpligt sätt. Alla nödvändiga analysmetoder bör fastställas, och man bör ha tillräckliga kunskaper om den kemiska stabiliteten i testsystemet. Under testets gång bestäms testkemikaliens koncentrationer med jämna mellanrum, enligt följande: flödeshastigheten för stamlösningarna med utspädnings- och testämne bör helst kontrolleras dagligen men minst två gånger per vecka, och bör inte variera med mer än 10 % genom hela testet. Det rekommenderas att de faktiska testkoncentrationerna mäts i samtliga kärl vid testets början och därefter varje vecka.

33. Det rekommenderas att resultaten baseras på de uppmätta koncentrationerna. Om koncentrationen av testkemikalien i lösningen på ett tillfredsställande sätt har hållits inom ± 20 % av den nominella koncentrationen under hela testperioden kan resultaten baseras antingen på nominella eller uppmätta värden.

34. Proverna kan behöva filtreras (t.ex. genom porstorlek 0,45 μm) eller centrifugeras. I sådana fall rekommenderas centrifugering. Om testmaterialet inte adsorberas på filter kan dock även filtrering godtas.

35. Under testet bör halten löst syre, temperaturen och pH-värdet mätas i samtliga kärl minst en gång per vecka. Den totala hårdheten och alkaliniteten bör mätas i kontrollerna och i ett kärl med den högsta koncentrationen minst en gång per vecka. Temperaturen bör helst övervakas kontinuerligt i minst ett testkärl.

Observationer

36. Ett antal allmänna (t.ex. överlevnad) och biologiska responser (t.ex. VTG-nivåer) bedöms under testets gång eller vid testets slut. Daglig kvantitativ övervakning av fruktsamheten krävs. Mätningen och utvärderingen av dessa endpoints och deras användbarhet beskrivs nedan.

Överlevnad

37. Fiskarna bör undersökas en gång per dag under testperioden. All mortalitet bör registreras, och döda fiskar bör avlägsnas så snart som möjligt. Döda fiskar ska inte ersättas, vare sig i kontrollerna eller behandlingskärlen. Könet på de fiskar som dött under testet bör fastställas genom makroskopisk utvärdering av könskörtlarna.

▼M7

Beteende och utseende

38. Allt onormalt beteende (i jämförelse med kontrollerna) ska registreras. Detta kan omfatta tecken på allmän toxicitet, inklusive hyperventilering, okoordinerat simbeteende, förlust av balansen och atypisk passivitet eller atypiskt ätbeteende. Dessutom bör yttre abnormiteter (t.ex. blödningar eller missfärgning) noteras. Sådana tecken på toxicitet bör övervägas noga vid tolkningen av data eftersom de kan vara tecken på koncentrationer vid vilka biomarkörerna för endokrin aktivitet inte är tillförlitliga. Sådana observationer rörande beteendet kan också tillhandahålla kvalitativ information som påverkar framtida krav för tester på fisk. Till exempel har territoriell aggressivitet observerats hos normala hanar och maskuliniserade honor av knölskallelöja under exponering för androgener, och för sebrafiskar har det typiska parnings- och romläggningsbeteendet efter ljusperiodens början vid gryningen reducerats eller fördröjts på grund av exponering för östrogener eller antiandrogener.

39. Eftersom vissa aspekter av utseendet (huvudsakligen färgen) snabbt kan ändras vid hantering är det viktigt att kvalitativa iakttagelser görs innan djuren avlägsnas från testsystemet. Erfarenheterna hittills med knölskallelöja tyder på att vissa endokrint aktiva kemikalier kan till en början åstadkomma förändringar av följande yttre egenskaper: kroppsfärg (ljus eller mörk), färgmönster (förekomst av vertikala strimmor) och kroppsform (huvudet och det pektorala området). Därför bör observationer av fiskarnas fysiska utseende göras under testets gång och vid studiens slut.

Fruktsamhet

40. Dagliga kvantitativa observationer av lek bör registreras per replikat. Äggproduktion bör registreras som antalet ägg/överlevande honor/dag per replikat. Äggen tas bort dagligen från testkärlen. Leksubstrat bör placeras i testkärlet för knölskallelöja och sebrafisk så att fisken kan leka under normala förhållanden. Tillägg 4 innehåller närmare information om rekommenderade leksubstrat för sebrafisk (tillägg 4A) och knölskallelöja (tillägg 4B). Medaka anses inte behöva leksubstrat.

Human avlivning av fisk

41. På dag 21, dvs. vid slutet av exponeringen, bör fiskarna avlivas med lämpliga mängder trikain (trikainmetansulfonat, metakain, MS-222 (CAS-nr 886-86-2), 100–500 mg/l buffrat med 300 mg/l $NaHCO_3$ (natriumvätekarbonat, CAS-nr 144-55-8) för att minska irritationen på slemhinnorna. Prov tas sedan på blod eller vävnad för bestämning av VTG, så som förklarades i avsnittet om vitellogenin.

Observation av sekundära könskaraktärer

42. Vissa endokrint aktiva kemikalier kan medföra förändringar i särskilda sekundära könskaraktärer (antal parningstuberkler hos knölskallelöjhanar, papillära utväxter hos medakahanar). Framför allt kan kemikalier med vissa verkningsmekanismer ge upphov till en onormal förekomst av sekundära könskaraktärer hos djur av det motsatta könet. Till exempel kan agonister som påverkar androgenreceptorer, såsom trenbolon, metyltestosteron och dihydrotestosteron, göra så att honor av knölskallelöja utvecklar tydliga parningstuberkler och att medakahonor utvecklar papillära utväxter (11, 20, 21). Det har också rapporterats att agonister som påverkar östrogenreceptorer kan minska antalet parningstuberkler och storleken på den dorsala nackvalken hos vuxna hanar av knölskallelöja (26, 27). Sådana makromorfologiska iakttagelser kan tillhandahålla användbar kvalitativ och kvantitativ information som kan påverka eventuella framtida krav för test på fisk. Antalet

▼M7

och storleken på parningstuberklerna hos knölskallelöja och de papillära utväxterna hos medaka kan mätas direkt eller mer praktiskt på konserverade exemplar. Rekommenderade förfaranden för utvärdering av sekundära könskaraktärer hos knölskallelöja och medaka finns i bilaga 5A respektive 5B.

Vitellogenin (VTG)

43. Blod samlas in från den kaudala artären/venen med ett hepariniserat mikrohematokrit-centrifugerat kapillärrör, eller alternativt genom hjärtpunktering med en spruta. Beroende på fiskens storlek kan man i allmänhet samla in mellan 5–60 µl blod per individ för knölskallelöja, och 5–15 µl per individ för sebrafisk. Plasman avskiljs från blodet genom centrifugering och lagras med proteashämmare vid –80 °C tills de analyseras med avseende på VTG. Alternativt använder man levern hos medaka, och för sebrafiskar kan huvud/stjärthomogenatet användas som vävnadskälla för bestämning av VTG (tillägg 6). Mätningen av VTG bör baseras på en validerad homolog ELISA-metod med användning av en homolog VTG-standard och homologa antikroppar. Det rekommenderas att man använder en metod som kan påvisa VTG-nivåer som är så låga som ett fåtal ng/ml plasma (eller ng/mg vävnad), vilket är bakgrundsnivån hos oexponerade hanfiskar.

44. Kvalitetskontrollen av VTG-analysen genomförs med hjälp av standarder, blankprov och minst duplikatanalyser. För varje ELISA-metod bör ett test för matriseffekt (effekten av provutspädning) genomföras för att bestämma den minsta utspädningsfaktorn för proven. Varje ELISA-platta som används för VTG-tester bör omfatta följande kvalitetskontrollprov: minst sex kalibreringsstandarder som täcker intervallet för de väntade VTG-koncentrationerna, och minst ett icke-specifikt blankprov för bindningsbestämning (som analyseras i två exemplar). Absorbansen i dessa blankprov bör vara mindre än 5 % av den högsta absorbansen i kalibreringsstandarderna. Minst två alikvoter (brunnsduplikat) av varje provutspädning analyseras. Brunnsduplikat som avviker med mer än 20 % bör analyseras på nytt.

45. Korrelationskoefficienten (R^2) för kalibreringskurvor ska vara högre än 0,99. En hög korrelation är dock inte tillräcklig för att garantera en adekvat prediktion av koncentrationerna inom alla intervaller. Förutom att kalibreringskurvan har en tillräckligt hög korrelationsgrad bör koncentrationen för varje standard, som beräknats utifrån kalibreringskurvan, ligga på mellan 70 och 120 % av dess nominella koncentration. Om de nominella koncentrationerna tenderar att avvika från kalibreringens regressionslinje (t.ex. vid lägre koncentrationer) kan det vara nödvändigt att dela upp kalibreringskurvan i låga respektive höga intervaller eller att använda en icke-linjär modell som gör att absorbansdata kan passas in på ett lämpligt sätt. Om kurvan delas upp bör $R^2 > 0,99$ gälla för båda linjesegmenten.

46. Detektionsgränsen (LOD) definieras som koncentrationen i den lägsta analytiska standarden, och gränsen för kvantifiering (LOQ) definieras som koncentrationen i den lägsta analytiska standarden multiplicerad med den lägsta utspädningsfaktorn.

47. Varje dag som VTG-tester utförs ska ett berikningsprov analyseras som beretts med en referensstandard för tester mellan laboratorier (tillägg 7). Förhållandet mellan den förväntade koncentrationen och den uppmätta koncentrationen rapporteras tillsammans med resultaten från varje försöksomgång som utförs på samma dag.

Utvärdering av histopatologiska undersökningar av könskörtlar

48. Tillsynsmyndigheterna kan kräva histopatologiska undersökningar av könskörtlarna för att studera målorganet på HPG-axeln efter kemisk exponering. Könskörtlarna fixeras antingen hela eller dissekeras. När en histopatologisk undersökning krävs tittar man på särskilda hormonrelaterade responser i könskörtlarna inom ramen för bedömningen av testkemikaliens endokrina

▼M7

aktivitet. Dessa diagnostiska responser omfattar huvudsakligen förekomsten av oocyter i testiklarna, Leydig-cellhyperplasi, minskad äggulebildning, ökade spermatogonier och perifollikulär hyperplasi. Andra skador på könskörtlarna, t.ex. oocyter i atresi, degenerering av testiklarna och stadieförändringar, kan ha olika orsaker. Vägledningsdokumentet om histopatologiska undersökningar av könskörtlar hos fiskar innehåller förfaranden för dissekering, fixering, uppdelning och histopatologisk utvärdering av könskörtlar (22).

DATA OCH RAPPORTERING

Utvärdering av biomarkörresponser med variansanalys (ANOVA)

49. För att identifiera en kemikalies potentiella aktivitet jämförs responser mellan behandlings- och kontrollgrupperna med hjälp av variansanalys (ANOVA). Om en lösningsmedelskontroll används bör ett lämpligt statistiskt test utföras mellan utspädningsvatten- och lösningsmedelskontrollerna för varje endpoint. Vägledning om hur man ska hantera data rörande utspädningsvatten- och lösningsmedelskontrollerna i den efterföljande statistiska analysen finns i OECD, 2006c (28). Alla biologiska responsdata bör analyseras och rapporteras separat per kön. Om de antaganden som krävs för parametriska metoder inte uppfylls – onormal fördelning (t.ex. Shapiro-Wilks test) eller heterogen varians (Bartletts test eller Levenes test) – bör man överväga att homogenisera varianserna genom transformering av data före ANOVA utförs. Alternativt kan en viktad ANOVA övervägas. Dunnetts test (parametriserade) på en eller flera parvisa jämförelser eller Mann-Whitneys test med parametrisk justering (Bonferroni) kan användas för icke-monotona dos-responser. Andra statistiska tester kan användas (t.ex. Jonckheere-Terpstras test eller Williams test) om dos-responsen är ungefärligen monoton. Det statistiska flödesschemat i bilaga 8 kan vara till hjälp när man beslutar vilket statistiskt test som är det mest ändamålsenliga att använda. Ytterligare information kan också erhållas från OECD:s dokument Current Approaches to Statistical Analysis of Ecotoxicity Data (28).

Rapportering av testresultat

50. Studiedata bör inbegripa följande:

Testanläggning:

— ansvarig personal och deras studieansvar,

— varje laboratorium ska ha demonstrerat sina kunskaper i användningen av ett antal representativa kemikalier.

Testkemikalie:

— karakterisering av testkemikalien,

— fysikalisk form och relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper,

— metod för beredning av testkoncentrationerna och hur ofta detta sker,

— information om stabilitet och biologisk nedbrytbarhet.

Lösningsmedel:

— karakterisering av lösningsmedlet (beskaffenhet, använd koncentration),

— motivering av valet av lösningsmedel (om annat än vatten).

▼M7

Försöksdjur:

— art och stam,

— leverantör och specifik leverantörsanläggning,

— fiskens ålder vid testets början och dess reproduktiva status samt lekstatus,

— uppgifter om förfarandet för acklimatisering av djuren,

— fiskens kroppsvikt vid början av exponeringen (från ett delprov av fiskbeståndet).

Testbetingelser:

— testförfarande som har använts (typ av test, fisktäthet, antalstäthet, osv.),

— metod för beredning av stamlösningar och flödeshastighet,

— nominella testkoncentrationer, uppmätta koncentrationer av testlösningarna varje vecka och den använda analysmetoden, medelvärden av de uppmätta värdena och standardavvikelserna i testkärlen samt bevis för att mätningarna hänför sig till testkemikaliens koncentrationer i en äkta lösning,

— utspädningsvattnets egenskaper (t.ex. pH, hårdhet, alkalinitet, temperatur, halten löst syre, restklornivåer, halten organiskt kol, uppslammade partiklar och eventuella andra gjorda mätningar),

— vattenkvaliteten i testkärlen: pH, hårdhet, temperatur och halten löst syre,

— detaljerade uppgifter om utfodringen (t.ex. typ av foder, källa, hur mycket fiskarna har fått och hur ofta samt, om möjligt, en analys av relevanta förorenande ämnen (t.ex. PCB, polycykliska aromatiska kolväten och bekämpningsmedel som innehåller organiska klorföreningar).

Resultat

— bevis för att kontrollerna uppfyller testets godkännandekriterier,

— uppgifter om dödlighet i alla koncentrationer och i kontrollen,

— de statistiska analystekniker som har använts, behandlingen av data och motivering av de tekniker som har använts,

— uppgifter om biologiska observationer av makromorfologi, inklusive sekundära könskaraktärer, äggproduktion och VTG,

— resultaten av dataanalyserna, helst i tabellform och grafisk form,

— förekomsten av eventuella ovanliga reaktioner hos fiskarna och eventuella synliga effekter som har orsakats av testkemikalien.

▼M7

RIKTLINJER FÖR TOLKNING OCH GODKÄNNANDE AV TEST-RESULTATEN

51. Detta avsnitt innehåller några överväganden som ska beaktas vid tolkningen av testresultaten för de olika endpoints som uppmätts. Resultaten bör tolkas med försiktighet när testkemikalien förefaller orsaka uppenbar toxicitet eller inverka på försöksdjurens allmäntillstånd.

52. När man fastställer intervallet för testkoncentrationerna bör man vara noga med att inte överskrida den högsta tolererade koncentrationen för att möjliggöra en meningsfull tolkning av data. Det är viktigt att ha minst en behandling där det inte finns några tecken på toxiska effekter. Tecken på sjukdom och tecken på toxiska effekter bör utvärderas noggrant och rapporteras. Det är till exempel möjligt att produktionen av VTG hos honor även kan påverkas av den allmänna toxiciteten och av icke-endokrina toxiska verkningsmekanismer, t.ex. hepatotoxicitet. Tolkningen av effekterna kan dock stärkas av andra behandlingsnivåer på vilka effekterna inte kompliceras av systemisk toxicitet.

53. Det finns en del aspekter som ska beaktas vid godkännandet av testresultaten. Som vägledning bör VTG-nivåerna i kontrollgrupperna med hanar och honor vara klart avgränsade och åtskilda med omkring tre storleksordningar för knölskallelöja och sebrafisk, och med ungefär en storleksordning för medaka. Exempel på intervallerna för de värden som påträffats i kontroll- och behandlingsgrupperna finns i valideringsrapporterna (1, 2, 3, 4). Höga VTG-värden hos hanar i kontrollen skulle kunna äventyra testresponsen och testets förmåga att påvisa svaga östrogenagonister. Låga VTG-värden hos honor i kontrollen skulle kunna äventyra testresponsen och testets förmåga att påvisa aromatashämmare och östrogenantagonister. Valideringsstudierna användes för att utarbeta dessa riktlinjer.

54. När det gäller kvantifieringen av äggproduktionen kan den uppvisa stora variationer [variationskoefficienten (CV) kan sträcka sig från 20 % till 60 %]. Detta påverkar möjligheterna att genom analysen detektera en signifikant minskning i äggproduktionen som är mindre än 70 %, allteftersom CV närmar 50 % eller mer. När CV begränsas till lägre värden (cirka 20–30 %) ger analysen en godtagbar effekt (80 %) för att detektera en minskning på 40–50 % i äggproduktionen. Den testmetod som används för knölskallelöja, inklusive fyra replikat per behandlingsnivå, bör ge större styrka för endpointen fruktsamhet, jämfört med en testmetod med endast två replikat.

55. Om ett laboratorium inte har utfört testet tidigare eller väsentliga förändringar (t.ex. förändringar av fiskstammen eller leverantören) har gjorts är det lämpligt att en teknisk kompetensstudie utförs. Det rekommenderas att man använder kemikalier som omfattar en rad olika verkningsmekanismer eller som påverkar ett antal olika endpoints. I praktiken uppmuntras varje laboratorium att samla in egna historiska kontrolldata för hanar och honor och att utföra ett test med en positiv kontrollkemikalie för östrogenaktivitet (t.ex. 17-beta-estradiol vid 100 ng/l, eller en känd svag agonist) som leder till ökade VTG-nivåer i hanfiskar, en positiv kontrollkemikalie för aromatashämmande effekter (t.ex. fadrozol eller prokloraz vid 300 µg/l) som leder till minskade VTG-nivåer hos honfiskar, och en positiv kontrollkemikalie för androgen aktivitet (t.ex. 17-beta-trenbolon vid 5 µg/l), som leder till induktion av sekundära könskaraktärer hos honor av knölskallelöja och medaka. Alla dessa data kan jämföras med tillgängliga data från valideringsstudierna (1, 2, 3) för att säkerställa laboratoriekompetensen.

56. I allmänhet bör VTG-mätningar anses vara positiva om det finns en statistiskt signifikant ökning av VTG hos hanar ($p < 0,05$), eller en statistiskt signifikant minskning hos honor ($p < 0,05$), åtminstone vid den högsta testdosen jämfört med kontrollgruppen och i avsaknad av tecken på allmän toxicitet. Ett positivt resultat bekräftas ytterligare om man kan påvisa ett

▼M7

biologiskt sannolikt samband mellan dosen och responskurvan. Som nämndes tidigare behöver inte minskningen av VTG uteslutande bero på endokrina orsaker. I allmänhet bör ett positivt resultat dock tolkas som bevis för endokrin aktivitet in vivo, och normalt bör man då vidta åtgärder för ytterligare klargöranden.

57. Tillsynsmyndigheterna kan kräva utvärdering av histopatologiska undersökningar av könskörtlarna för att fastställa försöksdjurens reproduktiva lämplighet och möjliggöra en sammanvägd bedömning av testresultaten. Histopatologisk undersökning av könskörtlarna kanske inte är nödvändig i fall där antingen VTG eller de sekundära könskaraktärerna är positiva (dvs. en ökning eller minskning av VTG eller induktion av sekundära könskaraktärer).

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 nr 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 nr 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 nr 78, Paris.

(4) Owens, J. W. (2007). Phase 3 report of the validation of the OECD Fish Screening Assay. CEFIC LRI Project, Endocrine. http://www.cefic-lri.org/index.php?page=projects (hämtad 18 september 2008).

(5) U.S. EPA (2007). Validation of the Fish Short-Term Reproduction Assay: Integrated Summary Report. 15 december 2007. US Environmental Protection Agency, Washington, DC. s. 104.

(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 nr 94, Paris.

(7) Sumpter JP och S. Jobling (1995). Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. Environmental Health Perspectives, 103 Suppl 7:173–178 Review.

(8) Pawlowski S., m.fl. (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, 277–291.

(9) Andersen L., m.fl. (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, 343–352.

(10) Ankley GT, m.fl. (2002). Evaluation of the aromatase inhibitor fadrozole in a short-term reproduction assay with the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Toxicological Sciences*, 67(1):121–130.

▼M7

(11) Panter G.H., m.fl. (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) Parker L.G., m.fl. (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):113–125.

(13) Panter G.H., m.fl. (1999). Application of an ELISA to quantify vitellogenin concentrations in fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to endocrine disrupting chemicals. CEFIC-EMSG research report reference AQ001. CEFIC, Bryssel, Belgien.

(14) Fenske M., m.fl. (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., m.fl. (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., m.fl. (2002). Vitellogenin induction by 17b-estradiol and 17a-ethinylestradiol in male zebrafish (*Danio rerio*). Comp. Biochem. Physiol. C 131: 531–539.

(17) Brion F., m.fl. (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., m.fl. (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., m.fl. (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., m.fl. (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., m.fl. (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 nr 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. Nr 23. Paris.

(24) Hutchinson T.H., m.fl. (2006a). Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review. Review. Aquatic Toxicology, 76, s .69–92.

(25) Hutchinson T.H., m.fl. (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., m.fl. (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.

(27) Martinovic D., m.fl. (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 nr 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. s. 110 ff.

(30) OECD (2012), *OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupters*, OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment nr 150, OECD, Paris.

▼**M7**

Tillägg 1

FÖRKORTNINGAR OCH DEFINITIONER

Kemikalie: ett ämne eller en blandning.

CV: variationskoefficient

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay.

HPG-axel: stressaxeln, bestående av hypotalamus, hypofysen och binjurebarken.

Fisktäthet: våtvikten fisk per vattenvolym.

MTC: den högsta tolererade koncentrationen, dvs. ungefär 10 % av LC_{50}.

Antalstäthet: antalet exemplar per vattenvolym.

Testkemikalie: alla ämnen eller blandningar som testas med denna testmetod.

VTG: vitellogenin är ett fosfolipoglykoprotein, en prekursor till ägguleprotein som normalt förekommer i alla sexuellt aktiva äggläggande honor.

▼M7

Tillägg 2

FÖRSÖKSBETINGELSER FÖR ENDOKRINT SCREENINGTEST PÅ FISK

1. Rekommenderade arter	Knölskallelöja (*Pimephales promelas*)	Medaka (*Oryzias latipes*)	Sebrafisk (*Danio rerio*)
2. Testtyp	Genomflödestest	Genomflödestest	Genomflödestest
3. Vattentemperatur	25 ± 2 °C	25 ± 2 °C	26 ± 2 °C
4. Belysningstyp	Fluorescerande lampor (brett spektrum)	Fluorescerande lampor (brett spektrum)	Fluorescerande lampor (brett spektrum)
5. Ljusintensitet	10–20 μE/m^2/s, 540–1000 lux, eller 50–100 ft-c (omgivande ljusnivåer i laboratoriet)	10–20 μE/m^2/s, 540–1000 lux, eller 50–100 ft-c (omgivande ljusnivåer i laboratoriet)	10–20 μE/m^2/s, 540–1000 lux, eller 50–100 ft-c (omgivande ljusnivåer i laboratoriet)
6. Ljusperiod (övergångar mellan gryning och skymning är frivilliga, men anses inte vara nödvändiga)	16 timmar ljus, 8 timmar mörker	12–16 timmar ljus, 12–8 timmar mörker	12–16 timmar ljus, 12–8 timmar mörker
7. Fisktäthet	< 5 g/l	< 5 g/l	< 5 g/l
8. Testbehållarens storlek	Minst 10 l	Minst 2 l	Minst 5 l
9. Testlösningens volym	Minst 8 l	Minst 1,5 l	Minst 4 l
10. Volymutbyte av testlösningar	Minst 6 per dag	Minst 5 per dag	Minst 5 per dag
11. Testorganismernas ålder	Se punkt 21	Se punkt 21	Se punkt 21
12. Ungefärlig våtvikt för en vuxen fisk (g)	Honor: 1,5 ± 20 % Hanar: 2,5 ± 20 %	Honor: 0,35 ± 20 % Hanar: 0,35 ± 20 %	Honor: 0,65 ± 20 % Hanar: 0,4 ± 20 %
13. Antal fiskar per testkärl	6 (2 hanar och 4 honor)	6 (3 hanar och 3 honor)	10 (5 hanar och 5 honor)
14. Antal behandlingar	= 3 (plus lämpliga kontroller)	= 3 (plus lämpliga kontroller)	= 3 (plus lämpliga kontroller)
15. Antal kärl per behandling	Minst 4	Minst 4	Minst 2
16. Antal fiskar per testkoncentration	16 vuxna honor och 8 hanar (4 honor och 2 hanar i varje replikatkärl)	12 vuxna honor och 12 hanar (3 honor och 3 hanar i varje replikatkärl)	10 vuxna honor och 10 hanar (5 honor och 5 hanar i varje replikatkärl)
17. Utfodring	Levande eller frysta vuxna eller nauplier av *Artemia* två eller tre gånger dagligen (ad libitum), kommersiellt tillgängligt foder eller en blandning av dessa	*Artemia*-nauplier två eller tre gånger dagligen (ad libitum), kommersiellt tillgängligt foder eller en blandning av dessa	*Artemia*-nauplier två eller tre gånger dagligen (ad libitum), kommersiellt tillgängligt foder eller en blandning av dessa

▼M7

18. Luftning	Ingen såvida inte koncentrationen löst syre sjunker under 60 % luftmättnad	Ingen såvida inte koncentrationen löst syre sjunker under 60 % luftmättnad	Ingen såvida inte koncentrationen löst syre sjunker under 60 % luftmättnad
19. Utspädningsvatten	Rent yt- eller brunnsvatten, rekonstituerat vatten eller avklorerat kranvatten	Rent yt- eller brunnsvatten, rekonstituerat vatten eller avklorerat kranvatten	Rent yt- eller brunnsvatten, rekonstituerat vatten eller avklorerat kranvatten
20. Förexponeringstid	7–14 dagar rekommenderas	7–14 dagar rekommenderas	7–14 dagar rekommenderas
21. Den kemiska exponeringens varaktighet	21-d	21-d	21-d
22. Biologiska endpoints	— överlevnad — beteende — fruktsamhet — sekundära könskaraktärer — VTG — eventuellt histopatologi av könskörtlarna	— överlevnad — beteende — fruktsamhet — sekundära könskaraktärer — VTG — eventuellt histopatologi av könskörtlarna	— överlevnad — beteende — fruktsamhet — VTG — eventuellt histopatologi av könskörtlarna
23. Testets godkännandekriterier	Löst syre ≥ 60 % av luftmättnadsvärdet, medeltemperatur 25 ± 2 °C, 90 % överlevnad i kontrollerna, uppmätta testkoncentrationer inom 20 % av medelvärdet för de uppmätta värdena per behandlingsnivå.	Löst syre ≥ 60 % av luftmättnadsvärdet, medeltemperatur 25 ± 2 °C, 90 % överlevnad i kontrollerna, uppmätta testkoncentrationer inom 20 % av medelvärdet för de uppmätta värdena per behandlingsnivå.	Löst syre ≥ 60 % av luftmättnadsvärdet, medeltemperatur 26 ± 2 °C, 90 % överlevnad i kontrollerna, uppmätta testkoncentrationer inom 20 % av medelvärdet för de uppmätta värdena per behandlingsnivå.

▼M7

Tillägg 3

NÅGRA KEMISKA EGENSKAPER FÖR GODTAGBART UTSPÄDNINGSVATTEN

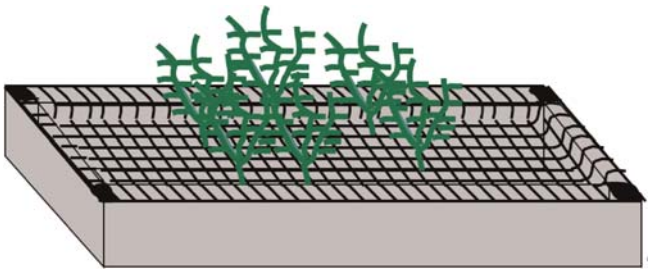
KOMPONENT	KONCENTRATIONER
Partiklar	< 20 mg/l
Halt av organiskt kol	< 2 mg/l
Icke-joniserad ammoniak	< 1 µg/l
Resterande mängd klor	< 10 µg/l
Total mängd bekämpningsmedel som innehåller organiska fosforföreningar	< 50 ng/l
Total mängd bekämpningsmedel som innehåller organiska klorföreningar plus polyklorerade bifenyler	< 50 ng/l
Total mängd organiskt klor	< 25 ng/l

▼M7

Tillägg 4A

LEKSUBSTRAT FÖR SEBRAFISK

Lekskål: en instrumentskål av glas, t.ex. 22 × 15 × 5,5 cm (längd × bredd × djup), täckt med ett avtagbart trådgaller av rostfritt stål (maskstorlek 2 mm). Gallret bör täcka instrumentskålens öppning på en nivå som ligger under kanten.



På gallret bör man fästa ett leksubstrat. Det ger fiskarna en struktur som de kan simma in i. Konstgjorda akvarieväxter av grön plast är till exempel lämpliga (Obs! man bör beakta möjligheten att testkemikalien adsorberas till plastmaterialet). Plastmaterialet bör lakas ut i en tillräcklig volym med varmt vatten under tillräckligt lång tid för att säkerställa att inga kemikalier läcker ut i testvattnet. Vid användning av material av glas bör man se till att fiskarna varken skadas eller trängs under sina energiska aktiviteter.

Avståndet mellan skålen och glasrutorna bör vara minst 3 cm för att säkerställa att fiskarna inte leker utanför skålen. Den rom som läggs på uppsamlingsbrickan faller ner genom gallret och kan samlas in 45–60 minuter efter att belysningen tänts. De genomskinliga äggen är inte vidhäftande och kan lätt räknas i transversellt ljus. Om man använder fem honor per kärl kan äggantal på under 20 per dag räknas som ett lågt, upp till 100 som ett genomsnittligt och mer än 100 som ett högt antal. Lekskålen bör tas bort, äggen samlas in och lekskålen återinföras i testkärlet antingen så sent som möjligt på kvällen eller mycket tidigt på morgonen. Tiden fram till återinförandet bör inte överstiga en timme. I annat fall kan leksubstratet som trigger framkalla individuell parning och lek på ovanliga tider. Om situationen kräver ett senare införande av lekskålen bör detta göras tidigast nio timmar efter att belysningen har tänts. Vid denna sena tidpunkt på dagen framkallas inte lekbeteendet längre.

▼M7

Tillägg 4B

LEKSUBSTRAT FÖR KNÖLSKALLELÖJA

Två eller tre kombinerade lekplattor och -skålar av keramik/plast/glas eller rostfritt stål placeras i varje testbehållare (t.ex. en 80 mm lång grå halvcirkelformad ränna i en 130 mm lång skål med uppvikt kant) (se bilden). Korrekt härdad PVC eller keramiska plattor har visat sig vara lämpliga som leksubstrat (Thorpe m.fl., 2007).

Det rekommenderas att plattorna är nötta för att förbättra vidhäftningen. Skålen bör också avskärmas för att förhindra fiskarna från att komma åt de lagda äggen såvida inte äggens vidhäftningsförmåga har påvisats för det leksubstrat som används.



Basen är utformad för att samla upp alla ägg som inte fastnar på plattans yta och därför annars skulle falla till akvariets botten (eller de ägg som läggs direkt på den platta plastbasen). Alla leksubstrat bör lakas ur i utspädningsvatten under minst tolv timmar före användning.

Thorpe, K. L, Benstead, R., Hutchinson, T.H och Tyler C. R. (2007). An optimised experimental test procedure for measuring chemical effects on reproduction in the fathead minnow, *Pimephales promelas*. Aquatic Toxicology 81, 90–98.

▼M7

Tillägg 5A

BEDÖMNING AV SEKUNDÄRA KÖNSKARAKTÄRER HOS KNÖLSKALLELÖJA FÖR PÅVISANDE AV VISSA ENDOKRINT AKTIVA KEMIKALIER

Översikt

Potentiellt viktiga kännetecken för det fysiska utseendet hos vuxna knölskallelöjor i tester av hormonstörande ämnen omfattar kroppsfärgen (dvs. ljus/mörk), färgmönster (dvs. förekomst eller avsaknad av vertikala strimmor), kroppsformen (dvs. formen på huvudet och det pektorala området, uttänjd buk), och särskilda sekundära könskaraktärer (dvs. parningstuberklernas antal och storlek, storleken på nackvalken och äggläggningsröret).

Parningstuberklerna återfinns på huvudet (nackvalken) på reproduktivt aktiva hanar av knölskallelöja, och sitter normalt i ett bilateralt symmetriskt mönster (Jensen m.fl., 2001). Kontrollhonor och unga hanar och honor utvecklar inte några tuberkler (Jensen m.fl., 2001). Det kan förekomma upp till åtta enskilda tuberkler runt ögonen och mellan hanarnas luktgropar. Det flesta och största tuberklerna är belägna i två parallella linjer omedelbart under luktgroparna och ovanför munnen. Många fiskar har grupper av tuberkler under underkäken. De som sitter närmast munnen förekommer i regel som ett enda par, medan de som är belägna mer ventralt kan bestå av upp till fyra tuberkler. Det faktiska antalet tuberkler är sällan mer än 30 (intervall 18–28, Jensen m.fl., 2001). De mest framträdande tuberklerna (mätt i antal) utgörs av en enda, relativt rund struktur med en höjd som ungefär motsvarar radien. De flesta reproduktivt aktiva hanar har också åtminstone några tuberkler som är förstorade och framträdande på ett sådant sätt att de inte kan särskiljas som enskilda strukturer.

Vissa typer av endokrinstörande kemikalier kan förorsaka abnorma förekomster av vissa sekundära könskaraktärer hos det motsatta könet. Agonister som påverkar androgenreceptorer, såsom 17α-metyltestosteron eller 17β-trenbolon, kan göra så att honor av knölskallelöja utvecklar tydliga parningstuberkler (Smith 1974, Ankley m.fl., 2001, 2003), medan agonister som påverkar östrogenreceptorer kan minska parningstuberklernas antal eller storlek hos hanar (Miles-Richardson m.fl., 1999, Harries m.fl., 2000).

Nedan följer en redogörelse av karakteriseringen av parningstuberkler hos knölskallelöja på grundval av de förfaranden som används vid USA:s Environmental Protection Agency i Duluth, Minnesota. Särskilda produkter och/eller utrustning kan ersättas med tillgängliga jämförbara material.

Fiskarna kan bäst observeras med hjälp av ett belyst förstoringsglas eller i ett belyst dissekeringsmikroskop med 3x förstoring. Observera fiskarna dorsalt och med den främre delen framåt (huvudet mot betraktaren).

— Placera fisken i liten petriskål (t.ex. 100 mm i diameter), med främre delen framåt och buksidan nedåt. Fokusera sökaren för att göra det möjligt att identifiera tuberklerna. Rulla långsamt och försiktigt fisken från sida till sida för att identifiera tuberkelområdena. Räkna och klassificera tuberklerna.

— Upprepa observationen på den ventrala huvudytan genom att placera fisken på ryggen med huvudet framåt i petriskålen.

— Observationerna bör göras inom två minuter för varje fisk.

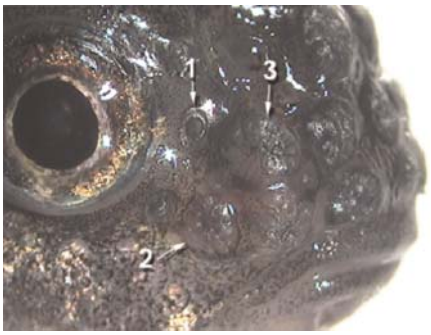
▼M7

Tuberkelräkning och klassificering

Sex särskilda områden har fastställts för bedömning av förekomsten och utvecklingen av tuberkler hos vuxna knölskallelöjor. En mall har utarbetats för att kartlägga var och i vilket antal tuberklerna förekommer (se slutet av detta tillägg). Antalet tuberkler registreras och deras storlek rangordnas kvantitativt enligt följande: 0–saknas, 1–förekommer, 2–förstorad och 3–framträdande, för varje organism (figur 1).

Klassificering 0–saknas: avsaknad av tuberkler. Klassificering 1–förekommer: definieras som alla tuberkler som har en enda punkt vars höjd är nästan lika med dess radie. Klassificering 2–förstorad: definieras som en vävnad som liknar en asterisk, vanligtvis med en stor radial bas med räfflor eller fåror som utgår från medelpunkten. På höjden är tuberkeln ofta mer taggig men kan ibland vara något avrundad. Klassificering 3–framträdande: refererar till vanligtvis ganska stora och rundade tuberkler med mindre avgränsad struktur. Ibland växer dessa tuberkler ihop och utgör en enda massa längs ett enskilt område eller en kombination av områden (B, C och D enligt beskrivning nedan). Färgen och utformningen liknar dem för klassificering 2 men är ibland ganska godtyckliga. Med hjälp av detta klassificeringssystem får man i allmänhet ett totalt tuberkelpoängvärde på < 50 för en normal kontrollhane som har 18–20 tuberkler (Jensen m.fl., 2001).

Figur 1



Det faktiska antalet tuberkler hos vissa fiskar kan vara större än antalet mallrutor för ett visst klassificeringsområde. Om detta är fallet kan ytterligare klassificeringsnummer läggas till inom, till höger eller till vänster om rutan. Mallen måste därför inte vara symmetrisk. Ytterligare en metod för kartläggning av tuberklerna som sitter ihop två och två eller vertikalt längs munnens horisontalplan är att dubbelmarkera två tuberkelklassificeringspoäng i en enda ruta.

Kartläggningsregioner:

A – Tuberkler belägna runt ögat. Kartläggs från rygg till buk runt främre kanten på ögat. Vanligtvis i flertal hos fullt utvecklade kontrollhanar, saknas hos kontrollhonor, vanligtvis parvis (en nära varje öga) eller i ental hos honor som exponerats för androgener.

B – Tuberkler belägna mellan luktgroparna (sinneskanalporer). Vanligtvis parvis hos kontrollhanar vid mer förhöjda utvecklingsnivåer (2–förstorad eller 3–framträdande). Saknas hos kontrollhonor med viss förekomst och utveckling hos honor som exponerats för androgener.

C – Tuberkler belägna omedelbart framför luktgroparna, parallellt med munnen. I allmänhet förstorade eller framträdande hos fullt utvecklade kontrollhanar. Förekommer eller förstorade hos mindre utvecklade hanar eller androgenbehandlade honor.

▼M7

D – Tuberkler belägna parallellt med munlinjen. I allmänhet klassificeras dessa som ”utvecklade” hos kontrollhanar. Saknas hos kontrollhonor men förekommer hos androgenexponerade honor.

E – Tuberkler belägna på underkäken, nära munnen, vanligtvis små och vanligen i par. Varierar hos kontrollhanar och behandlade hanar samt behandlade honor.

F – Tuberkler belägna ventralt jämfört med E. Vanligen små och i par. Förekommer hos kontrollhanar och androgenexponerade honor.

LITTERATURHÄNVISNINGAR

(1) Ankley, G. T., Jensen, K. M., Kahl, M. D., Korte, J. J. och Makynen, M. E. 2001. Description and evaluation of a short-term reproduction test with the fathead minnow *(Pimephales promelas). Environ Toxicol Chem* 20, 1276–1290.

(2) Ankley, G. T., Jensen, K. M., Makynen, E. A., Kahl, M. D., Korte, J. J., Hornung, M. W., Henry, T. R., Denny, J. S., Leino, R. L., Wilson, V. S., Cardon, M. C., Hartig, P. C. och Gray, E. L. 2003. Effects of the androgenic growth promoter 17-β trenbolone on fecundity and reproductive endocrinology of the fathead minnow. *Environ Toxicol Chem* 22, 1350–1360.

(3) Harries, J. E., Runnalls, T., Hill, E., Harris, C. A.,Maddix, S., Sumpter, J. P. och Tyler, C. R. 2000. Development of a reproductive performance test for endocrine disrupting chemicals using pair-breeding fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Environ Sci Technol* 34, 3003–3011.

(4) Jensen, K. M., Korte, J. J., Kahl, M. D., Pasha, M. S. och Ankley, G. T. 2001. Aspects of basic reproductive biology and endocrinology in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Comp Biochem Physiol* C 128, 127–141.

(5) Kahl, M. D., Jensen, K. M., Korte, J. J. och Ankley, G. T. 2001. Effects of handling on endocrinology and reproductive performance of the fathead minnow. *J Fish Biol* 59, 515–523.

(6) Miles-Richardson, S. R., Kramer, V. J., Fitzgerald, S. D., Render, J. A., Yamini, B., Barbee, S. J. och Giesy. J. P. (1999). Effects of waterborne exposure of 17-estradiol on secondary sex characteristics and gonads of fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Aquat Toxicol* 47, 129–145.

(7) Smith, R. J. F. 1974. Effects of 17α-methyltestosterone on the dorsal pad and tubercles of fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Can J Zool* 52, 1031–1038.

Tuberkelmall:

ID_____

Date_____

Poäng totalt _____

Klassificering

1- förekommer

2- förstorad

3- framträdande

	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

Tillägg 5B

BEDÖMNING AV SEKUNDÄRA KÖNSKARAKTÄRER HOS MEDAKA FÖR PÅVISANDE AV VISSA ENDOKRINT AKTIVA KEMIKALIER

Nedan följer en redogörelse av mätningen av de papillära utväxter ([1]) som utgör de sekundära könskaraktärerna hos medaka (*Oryzias latipes*).

(1) Efter avlägsnandet av levern (tillägg 6) ska kroppen placeras i en konisk tub innehållande ca 10 ml 10 % neutralt buffrat formalin (huvudet uppåt, stjärten nedåt). Om könskörteln fixeras i en annan lösning än 10 % neutralt buffrat formalin lägger man ett transversellt snitt över kroppen mellan den främre delen av analfenan och anus med ett rakblad, samtidigt som man undviker att skada gonoporen och könskörteln i sig (figur 3). Placera den kraniala delen av fiskkroppen i fixeringslösningen för att bevara könskörteln, och stjärtdelen av fiskkroppen i 10 % neutralt buffrat formalin enligt beskrivning ovan.

(2) Efter att fiskkroppen placerats i 10 % neutralt buffrat formalin fattar man tag i analfenans främre del med en pincett och viker den i ca 30 sekunder så att analfenan hålls utspänd. När man lyfter upp analfenan med pincetten bör man försiktigt fatta tag i den främre delen så att man inte skadar de papillära utväxterna.

(3) Efter att anafenan hållits utspänd i ca 30 sekunder bevaras fiskkroppen i 10 % neutralt buffrat formalin vid rumstemperatur fram till mätningen av de papillära utväxterna (mätningen ska utföras efter fixering i minst 24 timmar).

Mätning

(1) Fiskkroppen fixeras i 24 % neutralt buffrat formalin i minst 24 timmar. Ta därefter upp fiskkroppen ur den koniska tuben och torka av formalinet på filterpapper (eller en pappersservett).

(2) Lägg fisken med buksidan upp. Skär sedan försiktigt av analfenan med en liten dissektionssax (det är lämpligt att skära av analfenan tillsammans med en liten bit vävnad från fenfästet (pterygiofor).

(3) Fatta tag i den främre delen av den avskurna analfenan med en pincett och lägg den på ett objektglas med flera droppar vatten. Täck därefter analfenan med ett täckglas. Var noga med att inte skada de papillära utväxterna när analfenan hålls fast med pincetten.

(4) Räkna antalet ledplattor med papillära utväxter med hjälp av räknaren under ett biologiskt mikroskop (upprätt eller inverterat mikroskop). De papillära utväxterna kan kännas igen på en liten bildning av utväxter som är synbar på den bakre kanten av fenstrålen. Skriv in antalet ledplattor med papillära

([1]) Papillära utväxter förekommer normalt endast hos vuxna hanar och påträffas på den andra till den sjunde eller åttonde fenstrålen räknat från analfenans bakre kant (figur 1 och 2). Utväxterna förekommer sällan på den första fenstrålen från analfenans bakre kant. Detta standardförfarande omfattar mätning av utväxter på den första fenstrålen (fenstrålarna räknas i ordningsföljd från analfenans bakre kant i detta standardförfarande).

▼M7

utväxter på varje fenstråle i tabellen (t.ex. första fenstrålen: 0, andra fenstrålen: 10, tredje fenstrålen: 12 osv.), och skriv in summan av dessa antal i Excel-tabellen per enskild fisk. Vid behov kan man fotografera analfenan och räkna antalet ledplattor med papillära utväxter på fotot.

(5) Efter mätningen läggs analfenan i den koniska tuben som beskrivs i (1) och bevaras.

Fig.1.

Diagram som visar könsskillnaden i analfenans storlek och form. A, hane, B, hona. Oka, T. B., 1931. On the processes on the fin rays of the male of *Oryzias latipes* and other sex characters of this fish. J. Fac. Sci., Tokyo Univ., IV, 2: 209–218.

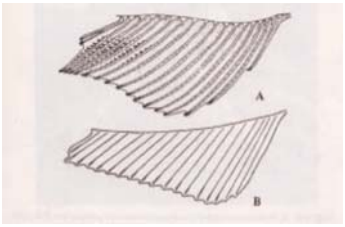


Fig.2.

A, Utväxter på fenstrålarnas ledplattor i analfenan. J.P. = ledplatta, A.S. = axelavstånd, P. = utväxt. B, Fenstrålens distala ände. Aktinotrikierna (Act.) sitter på spetsen. Oka, T. B., 1931. On the processes on the fin rays of the male of *Oryzias latipes* and other sex characters of this fish. J. Fac. Sci., Tokyo Univ., IV, 2: 209–218.

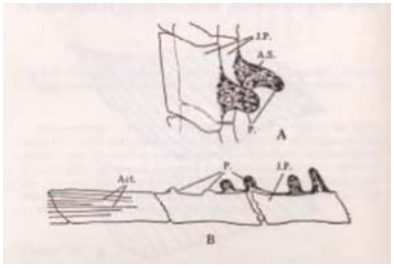
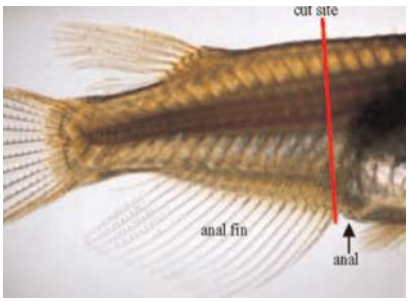


Fig.3.

Fotografi av fiskkropp som visar var snittet ska läggas när könskörteln fixeras i en annan fixeringslösning än 10 % neutralt buffrat formalin. I detta fall ska den övriga kroppen skäras av mellan analfenans främre kant och analöppningen med ett rakblad (röd linje), och fiskkroppens huvudsida läggs sedan i samma fixeringslösning som könskörteln och stjärtsidan läggs i 10 % neutralt buffrat formalin.



▼M7

Tillägg 6

REKOMMENDERADE FÖRFARANDEN FÖR PROVTAGNING FÖR VITELLOGENINANALYS

Man bör vara noga med att undvika korskontaminering mellan VTG-prover från hanar och honor.

Förfarande 1A: Knölskallelöja, insamling av blod från stjärtvenen/-artären

Efter bedövning skärs stjärtspolen delvis av med en skalpell och blod insamlas från den kaudala venen/artären med ett hepariniserat mikrohematokrit-centrifugerat kapillärrör. Efter att blodet har samlats in isoleras plasman snabbt genom centrifugering vid 15 000 g i 3 minuter (eller vid 15 000 *g* i 10 minuter vid 4 °C). Om så önskas kan procentandelen hematokrit fastställas efter centrifugeringen. Plasmadelen avlägsnas sedan från mikrohematokritröret och lagras i ett centrifugrör med 0,13 enheter aprotinin (en proteashämmare) vid – 80 °C tills bestämningen av VTG kan göras. Beroende på knölskallelöjans storlek (som är könsbestämd) uppgår mängden blod som kan samlas in till 5–60 mikroliter per fisk (Jensen m.fl., 2001).

Förfarande 1B: Knölskallelöja, insamling av blod från hjärtat

Alternativt kan blod också samlas in genom hjärtpunktering med en hepariniserad spruta (1 000 enheter heparin per ml). Blodet överförs till eppendorfrör (på is) och centrifugeras sedan (5 minuter, 7 000 *g*, rumstemperatur). Plasman bör överföras till rena eppendorfrör (i alikvoter om plasmavolymen är tillräckligt stor) och omedelbart frysas vid –80 °C tills den kan analyseras (Panter m.fl., 1998).

Förfarande 2A: Medaka, utskärning av levern

Avlägsna testfisken från testbehållaren

(1) Testfisken bör avlägsnas ur testbehållaren med hjälp av en liten rund håv. Var noga med att inte tappa ner testfisken i de andra testbehållarna.

(2) I princip ska testfiskarna avlägsnas i följande ordning: kontroll, lösningsmedelskontroll (i förekommande fall), lägsta koncentrationen, mittersta koncentrationen, högsta koncentrationen och positiv kontroll. Dessutom bör alla hanar avlägsnas från en testbehållare innan de återstående honorna avlägsnas.

(3) Könet på varje testfisk fastställs på grundval av externa sekundära könskaraktärer (t.ex. formen på analfenan).

(4) Placera testfisken i en behållare för transport och för den till arbetsstationen där levern skärs ut. Kontrollera att etiketterna på testbehållaren och transportbehållaren stämmer och bekräfta att det antal fiskar som har avlägsnats från testbehållaren och den antal fiskar som återstår i behållaren stämmer överens med vad som förväntas.

(5) Om könet inte kan fastställas genom fiskens externa utseende avlägsnas alla fiskarna från testbehållaren. I detta fall bör könet identifieras genom granskning av könskörteln eller de sekundära könskaraktärerna under ett stereomikroskop.

Utskärning av levern

(1) Överför testfisken från transportbehållaren till bedövningslösningen med den lilla runda håven.

▼M7

(2) Efter bedövning av testfisken överförs den till ett filterpapper (eller en pappersservett) med hjälp av en anatomisk pincett. När man lyfter upp testfisken bör man fatta tag med pincetten på sidorna av huvudet för att undvika att stjärten bryts av.

(3) Torka av vattnet på ytan av testfisken på filterpappret (eller pappersservetten).

(4) Lägg fisken med buksidan upp. Lägg därefter ett mindre tvärgående snitt halvvägs mellan den ventrala halsregionen och den mellersta abdominala regionen med hjälp av en dissektionssax.

(5) För in dissektionssaxen i det lilla snittet och öppna buken från en punkt som är belägen kaudalt från gälmanteln till den kraniala sidan av anus längs bukens mittlinje. Var noga med att inte föra in dissektionssaxen för djupt så att levern och könskörteln skadas.

(6) Utför följande steg under ett stereomikroskop.

(7) Placera testfisken med buksidan upp på pappersservetten (en petriskål av glas eller ett objektglas går också bra).

(8) Vik ut bukhålans väggar med en precisionspincett och blottlägg de inre organen. Det är även godtagbart att blottlägga de inre organen genom att vid behov avlägsna den ena sidan av bukhålans vägg.

(9) Blotta den del som förbinder levern med gallblåsan med hjälp av en annan precisionspincett. Tag därefter fatt i gallgången och skär av gallblåsan. Var noga med att inte skada gallblåsan.

(10) Tag fatt i matstrupen och skär loss mag-tarmkanalen från levern på samma sätt. Var försiktig så att inte tarminnehållet läcker ut. Skär loss den kaudala mag-tarmkanalen från anus och avlägsna den från bukhålan.

(11) Skär bort fettmassan och andra vävnader från leverns utsida. Var noga med att inte skada levern.

(12) Tag fatt i portasystemet med hjälp av en precisionspincett och avlägsna levern från bukhålan.

(13) Placera levern på objektglaset. Avlägsna om så behövs allt övrigt fett och all främmande vävnad (t.ex. bukhinna) från leverns yta med hjälp av precisionspincetten.

(14) Väg levern med ett 1,5 ml mikrorör som emballagevikt med en elektronisk analysvåg. Registrera värdet i en tabell (avläs: 0,1 mg). Bekräfta identifieringsinformationen på mikroröret som innehåller levern.

(15) Stäng mikrorörets lock. Förvara det i ett kylställ (eller ett isställ).

(16) När levern har avlägsnats diskas dissektionsinstrumenten eller ersätts med rena.

▼M7

(17) Avlägsna levrarna från alla fiskar i transportbehållaren enligt beskrivning ovan.

(18) När levrarna har skurits ut från alla fiskarna i transportbehållaren (dvs. alla hanar och honor i en testbehållare) placeras alla leverprover i ett provrörsställ med en etikett för identifiering och förvaras i en frys. När levrarna förs vidare till förbehandlingen strax efter utskärningen bärs proverna till nästa arbetsstation i ett kylställ (eller isställ).

Efter utskärningen av levern kan en histologisk undersökning av könskörtlarna göras på fiskkroppen och sekundära könskaraktärer mätas.

Prov

Lagra leverproverna från testfiskarna vid ≤ – 70 °C om de inte ska användas i förbehandlingen kort efter utskärningen.

Fig-1

Ett snitt läggs precis framför bröstfenorna med en sax.

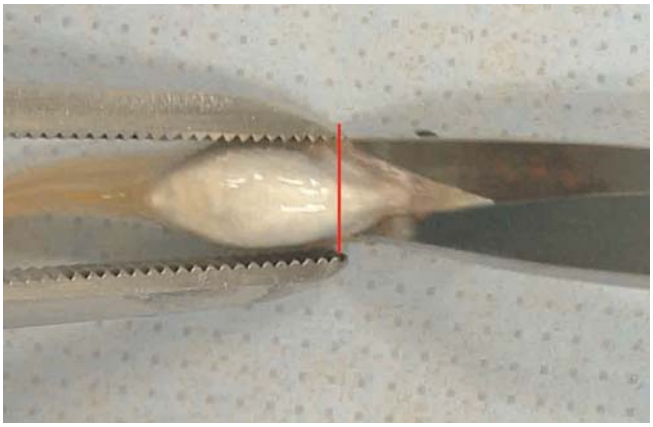


Fig-2

Buken öppnas längs mittlinjen med en sax till en punkt ungefär 2 mm kranialt från anus.



▼M7

Fig-3

Bukväggarna öppnas med en pincett för blottläggning av levern och andra interna organ.

(Alternativt kan bukväggarna fästas lateralt).

Pilen visar levern.

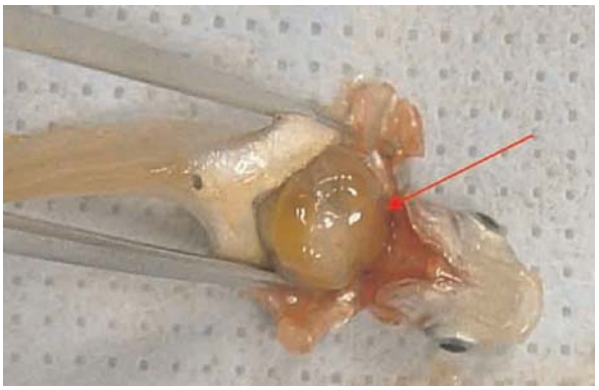


Fig-4

Levern friläggs och avlägsnas utan att skära med hjälp av en peang.

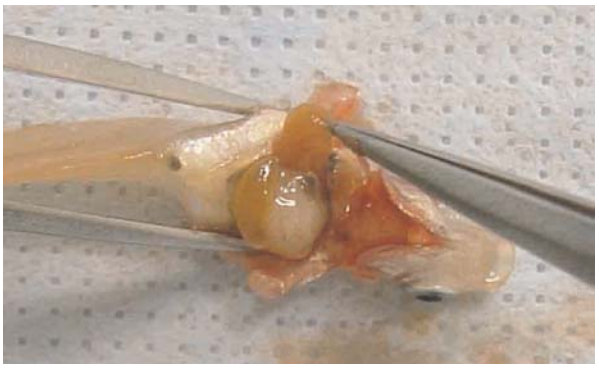
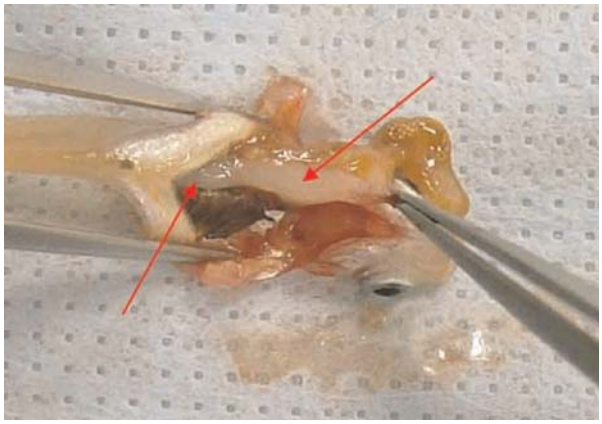


Fig-5

Tarmarna dras försiktigt ut med hjälp av peangen.



▼M7

Fig-6

Båda ändarna av tarmarna och eventuellt vidhängande tarmkäx klipps av med en sax.

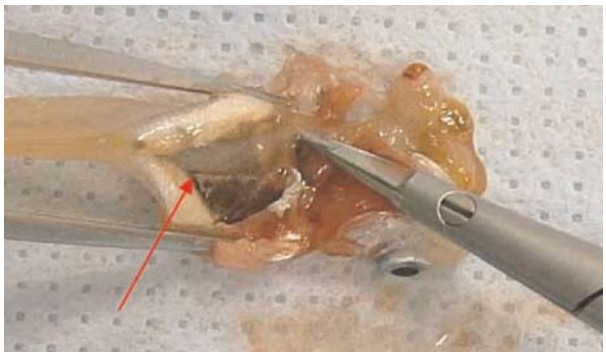


Fig-7 (hona)

Förfarandet är exakt detsamma för honor.

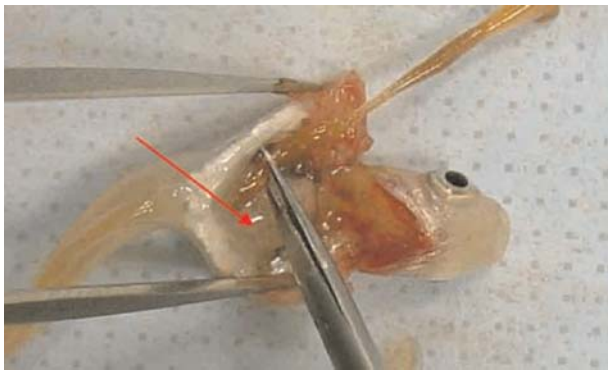


Fig-8

Det avslutade förfarandet.



▼M7

Förfarande 2B: Medaka (*Oryzias latipes*), förbehandling av levern för vitellogeninanalys

Ta fram flaskan med homogenatbuffert från ELISA-utrustningen och kyl den med krossad is (lösningens temperatur: ≤ 4° C). Om man använder homogenatbuffert från EnBio:s ELISA-system ska lösningen tinas vid rumstemperatur. Kyl sedan ner flaskan med krossad is.

Beräkna volymen av homogenatbuffert för levern på grundval av dess vikt (tillsätt 50 µl av homogenatbuffert per mg av levervikten). Om levern till exempel väger 4,5 mg är homogenatbuffertens volym för levern 225 µl. Gör upp en förteckning över homogenatbuffertens volym för alla levrarna.

Förberedelse av levern för förbehandling

(1) Ta ut det 1,5 ml mikrorör som innehåller levern ur frysen strax före förbehandlingen.

(2) Förbehandlingen av levrar från hanar bör genomföras före förbehandlingen av honornas levrar för att undvika kontaminering av vitellogenin. Förbehandlingen för testgrupperna bör dessutom utföras i följande ordning: kontroll, lösningsmedelskontroll (i förekommande fall), lägsta koncentrationen, mittersta koncentrationen, högsta koncentrationen och positiv kontroll.

(3) Antalet 1,5 ml mikrorör som innehåller leverprover som tagits ut ur frysen vid en viss tidpunkt bör inte överstiga det antal som kan centrifugeras vid den tidpunkten.

(4) Ordna 1,5 ml mikrorören som innehåller leverprover efter de nummer proven har i isstället (levern behöver inte tinas).

Utförandet av förbehandlingen

1) Tillsats av homogenatbuffert

Kontrollera på förteckningen vilken volym av homogenatbuffert som ska användas för ett visst leverprov och ställ in mikropipetten (volymintervall: 100–1 000 µl) på den lämpliga volymen. Fäst en ren spets på mikropipetten.

Pipettera upp homogenatbuffert från reagensflaskan och tillsätt 1,5 ml buffert i det 1,5 ml mikrorör som innehåller levern.

Tillsätt homogenatbuffert i alla 1,5 ml mikrorör som innehåller levrar enligt det förfarande som beskrivs ovan. Det finns ingen anledning att byta ut mikropipettspetsen med en ny. Om spetsen har blivit kontaminerad eller misstänks vara kontaminerad bör den dock bytas ut.

2) Homogenisering av levern

— Fäst en ny mortelstöt för homogenisering på mikrorörshomogenisatorn.

— För in mortelstöten i 1,5 ml mikroröret. Håll mikrorörshomogenisatorn och pressa levern mellan mortelstötens yta och innerväggen på 1,5 ml mikroröret.

— Kör mikrorörshomogenisatorn i 10–20 sekunder. Kyl ner 1,5 ml mikroröret med krossad is när detta görs.

▼M7

— Ta ut mortelstöten från 1,5 ml mikroröret och låt det stå i ca 10 sekunder. Kontrollera därefter suspensionen visuellt.

— Om man kan se delar av lever i suspensionen ska steg (3) och (4) upprepas tills ett godtagbart leverhomogenat har beretts.

— Kyl ner det suspenderade leverhomogenatet i isstället till dess att centrifugeringen utförs.

— Byt ut mortelstöten mot en ny för varje homogenat.

— Homogenisera alla levrar med homogenatbuffert enligt det förfarande som beskrivs ovan.

3) Centrifugering av det suspenderade leverhomogenatet

— Bekräfta att temperaturen i kylcentrifugkammaren är ≤ 5 °C.

— Ställ in 1,5 ml mikrorören som innehåller de suspenderade leverhomogenaten i kylcentrifugen (justera jämvikten vid behov).

— Centrifugera de suspenderade leverhomogenaten vid 13 000 g i 10 minuter vid ≤ 5 °C. Om supernatanterna är tillräckligt separerade kan dock centrifugalkraften och varaktigheten justeras efter behov.

— Efter centrifugeringen kontrolleras att supernatanterna är tillräckligt separerade (yta: fett, mellanparti: supernatant, bottenskikt: levervävnad). Om skikten inte är tillräckligt separerade centrifugeras suspensionen igen under samma betingelser.

— Avlägsna alla prov från kylcentrifugen och ordna dem efter de nummer proven har i isstället. Var noga med att inte återsuspendera de åtskilda skikten efter centrifugeringen.

4) Insamling av supernatanten

— Placera fyra 0,5 ml mikrorör i provrörsstället för lagring av supernatanten.

— Samla in 30 µl supernatant (separerad som det mellanliggande skiktet) med mikropipetten och tillsätt supernatanten till ett 0,5 ml mikrorör. Var noga med att inte få med fettet på ytan eller levervävnaden i det undre lagret.

— Samla in supernatanten och tillsätt den till två andra 0,5 ml mikrorör på samma sätt som beskrivs ovan.

— Samla in resten av supernatanten med mikropipetten (om möjligt: ≥ 100 µl). Tillsätt därefter supernatanten till de återstående 0,5 ml mikrorören. Var noga med att inte få med fettet på ytan eller levervävnaden i det undre lagret.

— Stäng locket på 0,5 ml mikroröret och anteckna supernatantens volym på etiketten. Kyl därefter omedelbart ner mikrorören i isstället.

— Byt ut spetsen på mikropipetten till en ny för varje supernatant. Om en stor mängd fett fäster sig vid spetsen bör den omedelbart bytas ut med en ny för att undvika kontaminering av leverextraktet med fett.

▼M7

— Fördela hela den centrifugerade supernatanten i 0,5 ml mikrorör enligt det förfarande som beskrivs ovan.

— Efter att supernatanten har tillsatts till 0,5 ml mikrorör placeras de alla i provrörsstället med identifieringsetiketten och fryses sedan omedelbart ner i frysen. Om VTG-halterna ska mätas omedelbart efter förbehandlingen hålls ett 0,5 ml mikrorör (med 30 µl supernatant) kallt i provrörsstället och överförs sedan till arbetsstationen där ELISA-testet utförs. I ett sådant fall ska alla övriga mikrorör placeras i provrörsställen och frysas ner i frysen.

— Efter insamling av supernatanten kasseras restprodukterna på lämpligt sätt.

Lagring av provet

Lagra 0,5 ml mikrorören som innehåller supernatanten av leverhomogenatet vid ≤ – 70 °C tills de används för ELISA-testet.

Förfarande 3A: Sebrafisk, insamling av blod från den kaudala venen/artären

Omedelbart efter bedövning skärs stjärtspolen av transversalt, och blodet insamlas från den kaudala artären/venen med ett hepariniserat mikrohematokrit-centrifugerat kapillärrör. Volymerna blod varierar mellan 5 och 15 mikroliter beroende på fiskens storlek. En lika stor mängd buffertlösning med aprotinin (6 mikrogram i fosfatbuffrad saltlösning (PBS)) tillsätts i mikrokapillärröret och plasman separeras från blodet genom centrifugering (5 minuter vid 600 *g*). Plasman samlas i provrören och lagras vid – 20 °C tills de analyseras med avseende på VTG eller andra proteiner av intresse.

Förfarande 3B: Sebrafisk, insamling av blod genom hjärtpunktering

För att undvika koagulering av blod och nedbrytning av proteiner tas proven i en buffertlösning bestående av fosfatbuffrad saltlösning (PBS) som innehåller heparin (1 000 enheter/ml) och proteashämmaren aprotinin (2 TIU/ml). Som ingredienser i buffertlösningen rekommenderas heparin, ammoniumsalt och frystorkad aprotinin. För blodprovstagning rekommenderas en spruta (1 ml) med en fast tunn nål (t.ex. Braun omnikan-F). Sprutan ska fyllas på förhand med en buffert (ca 100 mikroliter) för att helt eluera de små blodvolymerna från varje fisk. Blodproven tas genom hjärtpunktering. Till att börja med bör fisken bedövas med MS-222 (100 mg/l). En lämplig bedövningsnivå gör det möjligt för användaren att urskilja sebrafiskens hjärtslag. Medan hjärtpunkteringen utförs ska sprutans kolv hållas under svagt tryck. Samla in blodvolymer på mellan 20 och 40 ml. Efter hjärtpunkteringen ska blod/buffert-blandningen tillsättas i provröret. Plasman separeras från blodet genom centrifugering (20 min., 5 000 *g*) och bör förvaras vid – 80 °C tills den behövs för analys.

Förfarande 3C: Standardförfarande: Sebrafisk, homogenisering av huvud och stjärt

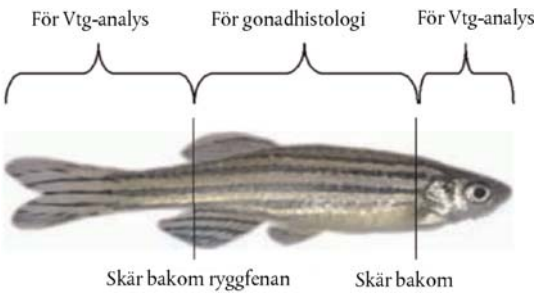
1. Fiskarna bedövas eller avlivas i enlighet med testbeskrivningen.

2. Huvudet och stjärten skärs av i enlighet med figur 1.

Obs: *Alla dissektionsinstrument och skärbrädan bör sköljas och rengöras ordentligt (t.ex. med 96 % etanol) mellan hanteringen av varje enskild fisk för att förhindra ”vitellogenin-förorening” från honor eller inducerade hanar till oinducerade hanar*.

▼M7

Figur 1



3. Den sammanlagda vikten av huvud och stjärt från varje fisk mäts till närmaste mg.

4. Efter vägning placeras delarna i lämpliga rör (t.ex. 1,5 ml eppendorfrör) och fryses vid – 80 °C tills homogeniseringen, eller homogeniseras direkt på is med två mortelstötar av plast. (Andra metoder kan användas om de utförs på is och resultatet är en homogen massa). Obs: *Rören ska numreras noggrant så att fiskarnas huvud och stjärt kan hänföras till deras respektive kroppar, som används för histologisk undersökning av könskörtlarna*.

5. När en homogen massa erhållits tillsätts iskall **homogeniseringsbuffertlösning** ([1]) med en mängd på 4 gånger vävnadens vikt. Fortsätt att arbeta med mortelstötarna tills blandningen är homogen. Obs: *Nya mortelstötar används för varje fisk*.

6. Proven läggs på is tills centrifugeringen vid **4 °C** och 50 000 *g* i 30 minuter.

7. Använd en pipett för att dosera ut portioner på 20 µl supernatant i **minst** två rör genom att doppa pipettens spets under fettlagret på ytan och försiktigt suga upp supernatanten utan att få med fragment av fett eller små bitar.

8. Rören förvaras vid – 80 °C fram till användningen.

([1]) Buffertlösning för homogenisering
— 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 1 % proteashämmarblandning (Sigma): 12 ml Tris-HCl pH 7,4 + 120 µl proteashämmarblandning.
— TRIS: TRIS-ULTRA PURE (ICN), t.ex. från Bie & Berntsen, Danmark.
— Proteashämmarblandning: Från Sigma (för däggdjursvävnader), produkt nr P 8340.
Anmärkning: Buffertlösningen för homogenisering bör användas samma dag som den beretts. Lägg den på is under användningen.

▼M7

Tillägg 7

VITELLOGENINBERIKNINGSPROVER OCH REFERENSSTANDARD FÖR TESTER MELLAN LABORATORIER

Varje dag som VTG-tester utförs ska ett berikningsprov analyseras som beretts med en referensstandard för tester mellan laboratorier. VTG som används för beredning av referensstandarden för tester mellan laboratorier ska komma från en annan sats än den som används för att bereda kalibreringsstandarderna för det test som utförs.

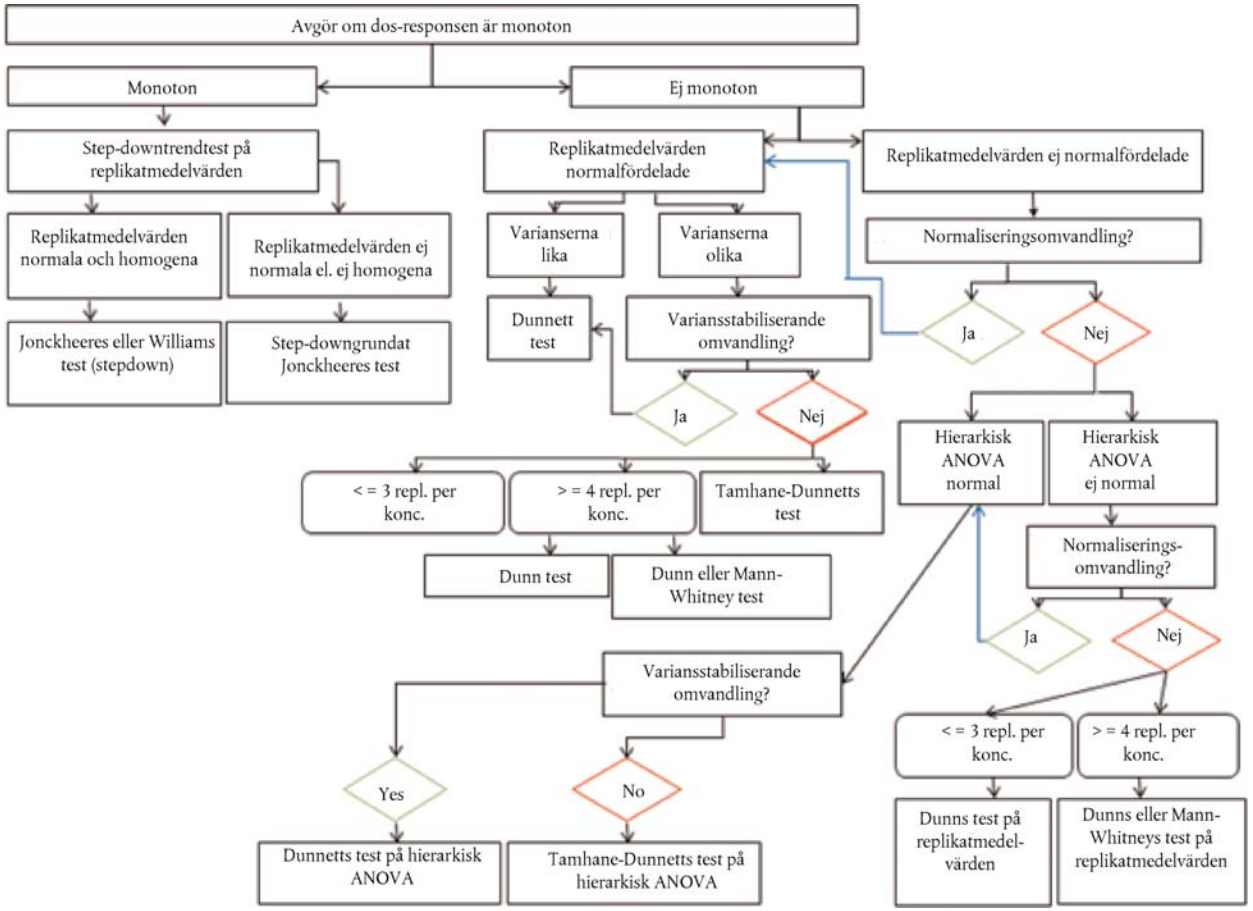
Ett berikningsprov bereds genom att man tillsätter en känd mängd av referensstandarden för tester mellan laboratorier till ett prov med plasma från kontrollhanar. Provet berikas tills en VTG-koncentration på mellan 10 och 100 gånger den förväntade vitellogeninkoncentrationen i hanliga kontrollfiskar uppnås. Det berikade provet med hanlig kontrollplasma kan komma från en enda fisk eller vara en blandning av flera olika fiskar.

Ett delprov av den oberikade hanliga kontrollplasman analyseras i minst två duplikatbrunnar. Det berikade provet analyseras också i minst två duplikatbrunnar. Den genomsnittliga mängden vitellogenin i de två icke-berikade hanliga kontrollproven läggs till den beräknade mängden VTG som lagts till berikningsproverna i syfte att fastställa en förväntad koncentration. Förhållandet mellan denna förväntade koncentration och den uppmätta koncentrationen rapporteras tillsammans med resultaten från varje försöksomgång som utförs på samma dag.

▼M7

Tillägg 8

FLÖDESSCHEMA ÖVER BESLUTSGÅNGEN FÖR DEN STATISTISKA ANALYSEN



▼M7

C.49 AKUT TOXICITETSTEST PÅ FISKEMBRYO (FET)

INLEDNING

1. Denna testmetod motsvarar OECD:s testriktlinje (TG) 236 (2013). Här beskrivs ett FET-test med sebrafisk (*Danio rerio*). Detta test är utformat för att bestämma kemikaliers akuta toxicitet under fiskars embryonala utveckling. FET-testet är baserat på studier och valideringar av sebrafisk (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) (14). FET-testet har framgångsrikt tillämpats på ett brett spektrum kemikalier med olika verkningssätt, löslighet, volatilitet och hydrofobicitet (översikt ges i 15 och 16).

2. De definitioner som används i denna testmetod finns i tillägg 1.

TESTPRINCIP

3. Nyligen befruktade sebrafiskägg exponeras för testkemikalien under en 96-timmarsperiod. Var 24:e timme registreras upp till fyra apikala observationer som indikatorer för dödlighet (6): i) koagulering av befruktade ägg, ii) avsaknad av somitbildning, iii) svansknoppen avlossas inte från gulesäcken och (iv) avsaknad av hjärtslag. I slutet av exponeringstiden bestäms akut toxicitet baserat på ett positivt resultat i någon av de fyra apikala observationerna och LC_{50} beräknas.

INLEDANDE ÖVERVÄGANDEN

4. Användbar information om ämnesspecifika egenskaper innefattar strukturformel, molekylvikt, renhet, stabilitet i vatten och ljus, pK_a och K_{ow}, vattenlöslighet och ångtryck samt resultat av ett test avseende biologisk lättnedbrytbarhet (TM C.4 (17) eller TM C.29 (18)). Löslighet och ångtryck kan användas för att beräkna Henrys konstant, som anger eventuell förlust på grund av avdunstning av testkemikalien. Man bör ha tillgång till en tillförlitlig analysmetod för kvantifiering av ämnet i testlösningen. Metoden bör ha känd och rapporterad noggrannhet och detektionsgräns.

5. Om testmetoden används för att testa en blandning ska dess sammansättning karakteriseras så långt detta är möjligt, t.ex. beståndsdelarnas kemiska identitet, deras kvantitativa förekomster och deras ämnesspecifika egenskaper (se punkt 4). Innan testmetoden för lagstadgad testning av en blandning används bör man överväga om den kommer att ge godtagbara resultat för det avsedda föreskrivna syftet.

6. När det gäller ämnen som kan aktiveras via metabolism, finns det bevis för att sebrafiskembryon har biotransformationskapacitet (19) (20) (21) (22). Fiskembryons ämnesomsättning liknar dock inte alltid unga eller vuxna fiskars ämnesomsättning. Det protoxiska ämnet allylalkohol (9) har t.ex. utelämnats i FET-testet. Om det finns indikationer på att metaboliter eller andra omvandlingsprodukter av betydelse kan vara giftigare än huvudföreningen bör testet även utföras med dessa metaboliter/omvandlingsprodukter och dessa resultat bör även beaktas i slutsatserna om testkemikaliens toxicitet. Alternativt kan ett annat test utföras där ämnesomsättningen beaktas ytterligare.

7. Embryon förväntas inte vara känsliga för ämnen med en molekylvikt på $\geq$ 3 kDa, en mycket komplex och voluminös molekylstruktur, och ämnen som orsakar fördröjd kläckning och kan hindra eller minska exponeringen efter kläckning. Detta beror på ämnets begränsade biotillgänglighet och därför kan andra toxicitetstester vara lämpligare.

▼M7

TESTETS GILTIGHET

8. För att testresultaten ska vara giltiga måste följande kriterier vara uppfyllda:

a) Den totala befruktningsgraden för alla ägg som samlats in bör vara ≥ 70 % i det testade partiet.

b) Vattentemperaturen bör hållas vid 26 ± 1 °C i testkärlen under testet.

c) Det totala antalet överlevande embryon i den negativa kontrollen (utspädningsvatten) och, i förekommande fall, i lösningsmedelskontrollen bör vara ≥ 90 % fram till slutet av 96-timmarsexponeringen.

d) Exponering för den positiva kontrollen (t.ex. 4,0 mg/l 3,4-dikloranilin för sebrafisk) bör leda till en minimal dödlighet på 30 % i slutet av 96-timmarsexponeringen.

e) Kläckningsgraden i den negativa kontrollen (i förekommande fall även i lösningsmedelskontrollen) bör vara ≥ 80 % i slutet av 96-timmarsexponeringen.

f) I slutet av 96-timmarsexponeringen bör koncentrationen av upplöst syre i den negativa kontrollen och den högsta testkoncentrationen vara ≥ 80 % av luftmättnadsvärdet.

BESKRIVNING AV TESTMETODEN

9. En översikt över rekommenderade underhålls- och testförhållanden ges i tillägg 2.

Utrustning

10. Följande utrustning behövs:

a) Fisktankar tillverkade av kemiskt inert material (t.ex. glas) och tillräckligt stora för den rekommenderade fisktätheten (se ”Hållande av avelsfisk”, punkt 14).

b) Inverterat mikroskop och/eller stereolupp med en kapacitet på minst 80 gångers förstoring. Om det rum som används för att registrera observationer inte kan justeras till 26 ± 1 °C krävs en temperaturkontrollerad ”Cross Movement Stage” eller andra metoder för att upprätthålla temperaturen.

c) Testkärl, t.ex. standard 24-hålsplattor med ett djup på cirka 20 mm. (Se ”Testkärl”, punkt 11),

d) Exempelvis självhäftande folie för att täcka 24-hålsplattorna.

e) Inkubator eller luftkonditionerat rum med kontrollerad temperatur, som gör det möjligt att hålla 26 ±1 °C i hålen (eller testkärlen).

f) pH-mätare.

g) Syremätare.

h) Utrustning för bestämning av vattnets hårdhetsgrad och ledningsförmåga.

i) Lekfälla: instrumentbrickor av glas, rostfritt stål eller andra inerta material, trådnät (nätstorlek 2 ± 0,5 mm) av rostfritt stål eller annat inert material för att skydda äggen när de väl lagts, leksubstrat (t.ex. konstgjorda växter av inert material) (TM C.48 tillägg 4a (23)).

j) Pipetter med vidgade öppningar för att samla in äggen.

▼M7

k) Glaskärl för beredning av olika testkoncentrationer och utspädningsvatten (bägare, mätkolvar, mätglas och graderade pipetter) eller för att samla in sebrafiskägg (t.ex. bägare, kristalliseringsfat).

l) Om alternativa exponeringssystem, t.ex. genomflöde (24) eller passiv dosering (25), används för utförandet av testet behövs lämplig lokal och utrustning.

Testbehållare

11. Testbehållare av glas eller polystyren bör användas (t.ex. 24-hålsplattor med en fyllningskapacitet på 2,5–5 ml per hål). Vid misstanke om adsorption till polystyren (t.ex. för opolära plana ämnen med hög K_{ow}) bör inert material (glas) användas för att minska adsorptionsförluster (26). Testbehållarna bör placeras slumpvis i inkubatorn.

Vatten och testförhållanden

12. Utspädning av underhållsvattnet rekommenderas för att uppnå hårdhetsnivåer som är typiska för många olika ytvatten. Utspädningsvattnet bör beredas från rekonstituerat vatten (27). Den resulterande hårdhetsgraden bör motsvara 100–300 mg/l $CaCO_3$ för att förhindra överdriven utfällning av kalciumkarbonat. Annat välkarakteriserat yt- eller brunnsvatten kan användas. Det rekonstituerade vattnet kan anpassas till underhållsvatten med låg hårdhetsgrad genom utspädning med avjonat vatten upp till ett förhållande på 1:5 till en lägsta hårdhetsgrad på 30–35 mg/l $CaCO_3$. Vattnet luftas till syremättnad innan testkemikalien tillsätts. Temperaturen bör hållas vid 26 ± 1 °C i brunnarna under hela testet. pH-värdet bör ligga inom ett intervall på 6,5–8,5 och inte variera med mer än 1,5 enheter inom detta intervall under testet. Om pH inte förväntas hålla sig inom intervallet bör en pH-justering göras innan testet inleds. pH-justeringen bör göras på ett sådant sätt att stamlösningens koncentration inte ändras i någon betydande utsträckning och ingen kemisk reaktion eller utfällning av testkemikalien uppstår. Användning av väteklorid (HCl) och natriumhydroxid (NaOH) för att korrigera pH-värdet i lösningarna med testkemikalien rekommenderas.

Testlösningar

13. Testlösningar av de valda koncentrationerna kan beredas t ex. genom spädning av en stamlösning. Stamlösningen bör helst beredas genom att man helt enkelt blandar eller skakar testkemikalien i utspädningsvattnet på mekanisk väg (t.ex. omrörning och/eller ultraljud). Om testkemikalien är svårlöslig i vatten bör man följa de förfaranden som beskrivs i OECD:s vägledningsdokument nr 23 om hantering av svåra ämnen och blandningar (28). Man bör undvika att använda lösningsmedel, men det kan i vissa fall krävas för att framställa en stamlösning med lämplig koncentration. Om ett lösningsmedel används som hjälpmedel i beredningen av stamlösningen bör dess slutliga koncentration inte överskrida 100 µl/l och vara densamma i alla testkärl. När lösningsmedel används krävs en extra lösningsmedelskontroll.

Hållande av avelsfisk

14. Ett avelsbestånd av oexponerad sebrafisk av vildtyp med väldokumenterad fertilitetsgrad används för äggproduktion. Fisken bör vara fri från makroskopiskt urskiljbara symtom på infektion och sjukdom och bör inte ha genomgått läkemedelsbehandling (akut eller profylaktisk) under två månader innan lek. Avelsfisken hålls i akvarier med en rekommenderad fisktäthet på 1 liter vatten per fisk och en fast ljusperiod på 12–16 timmar (29) (30) (31) (32) (33). Filtreringsgraden bör justeras så att den blir optimal och en överdrivet

▼M7

hög filtreringsgrad som orsakar kraftiga störningar i vattnet bör undvikas. Se tillägg 2 för utfodringsförhållanden. Överskottsfoder bör undvikas och man bör regelbundet kontrollera vattenkvaliteten och att akvarierna är rena. Vattnet bör återställas till sitt ursprungliga tillstånd vid behov.

Kvalifikationsprövning

15. Som referenskemikalie bör 3,4-dikloranilin (används i valideringsstudierna (1)(2)) testas i en fullständig koncentrationsrespons för att kontrollera känsligheten hos den fiskstam som används, företrädesvis två gånger per år. Alla laboratorier som tar denna testmetod i bruk för första gången bör använda referenskemikalien. Ett laboratorium kan använda denna kemikalie för att visa sin tekniska kompetens att genomföra analysen innan de lämnar in data för det föreskrivna syftet.

Äggproduktion

16. Sebrafiskägg kan produceras via lekgrupper (i individuella lektankar) eller via ”masslek” (i underhållstankarna). När det gäller lekgrupper bör hanar och honor (t.ex. i ett förhållande på 2:1) i en avelsgrupp placeras i lektankar några timmar innan mörkerperioden inleds dagen före testet. Eftersom leken ibland uteblir i lekgrupper av sebrafisk rekommenderas parallell användning av minst tre lektankar. För att undvika systematiska genetiska avvikelser samlas ägg in från minst tre avelsgrupper, blandas och väljs ut slumpvis.

17. För insamling av äggen placeras lekfällor i lek- eller underhållstankarna innan mörkerperioden inleds dagen före testet eller innan ljusperioden inleds på dagen för testet. För att undvika predation av ägg av vuxen sebrafisk täcks lekfällorna med inert trådnät av lämplig maskstorlek (cirka 2 ± 0,5 mm). Om det anses nödvändigt kan konstgjorda växter tillverkade av inert material (t.ex. plast eller glas) fästas vid nätet som lekstimulus (3)(4)(5)(23)(35). Vittrat plastmaterial som inte läcker (t.ex. ftalater) bör användas. Parning, lek och befruktning sker inom 30 minuter efter gryningen och lekfällorna med de insamlade äggen kan då försiktigt avlägsnas. Sköljning av äggen med rekonstituerat vatten efter insamling från lekfällorna rekommenderas.

Differentiering av äggen

18. De befruktade äggen genomgår den första klyvningen vid 26 °C efter cirka 15 minuter och de påföljande samtidiga klyvningarna bildar 4, 8, 16 och 32 cellblastomerer (se tillägg 3)(35). Under dessa stadier kan de befruktade äggen tydligt identifieras genom utvecklingen av en blastula.

FÖRFARANDE

Exponeringsförhållanden

19. Tjugo embryon per koncentration (ett embryo per hål) utsätts för testkemikalien. Exponeringen bör vara sådan att ± 20 % av den nominella kemiska koncentrationen bibehålls under hela provningen. Om detta inte är möjligt i ett statiskt system bör ett hanterbart halvstatiskt förnyelseintervall tillämpas (t.ex. förnyelse var 24:e timme). I dessa fall måste exponeringskoncentrationerna minst kontrolleras i de högsta och lägsta testkoncentrationerna i början och slutet av varje exponeringsintervall (se punkt 36). Om en exponeringskoncentration på ± 20 % av de nominella koncentrationerna inte kan upprätthållas måste alla koncentrationer mätas i början och slutet av varje exponeringsintervall (se punkt 36). Vid förnyelse är det viktigt att se till att embryona täcks av en liten mängd av den gamla testlösningen så att de inte

▼M7

torkar ut. Testet kan anpassas för att uppfylla testkraven för specifika ämnen (t.ex. genomflöde (24), passiva doseringssystem (25) för enkelt nedbrytbara eller starkt adsorberande ämnen (29) eller andra för flyktiga ämnen (36) (37)). Det är viktigt att undvika eventuell stress för embryona. Testkärlen bör konditioneras med provlösningarna under minst 24 timmar innan testet inleds. Testförhållandena sammanfattas i tillägg 2.

Testkoncentrationer

20. I regel krävs minst fem koncentrationer av testkemikalien med ett fast koncentrationsförhållande som inte överstiger 2,2 för att uppfylla de statistiska kraven. Om färre än fem koncentrationer används måste detta motiveras. Den högsta testkoncentrationen ska helst ge 100-procentig dödlighet, och den lägsta testkoncentrationen ska helst inte ge någon observerbar effekt alls enligt punkt 28. Före det slutliga testet kan ett preliminärt test göras för att fastställa lämpligt koncentrationsintervall. Det preliminära testet görs vanligtvis med tio embryon per koncentration. Anvisningarna nedan avser ett test med 24-hålsplattor. Om olika testkärl (t.ex. små petriskålar) används eller fler koncentrationer testas måste anvisningarna anpassas därefter.

21. Detaljer och visuella instruktioner för fördelningen av koncentrationer mellan 24-hålsplattorna återfinns i punkt 27 och bilaga 4, figur 1.

Kontroller

22. Kontroller med utspädningsvatten krävs både som negativ kontroll och som intern kontroll av plattorna. Om fler än ett dött embryo observeras i den interna kontrollen av plattorna förkastas plattan, vilket minskar antalet koncentrationer som används för att härleda LC_{50}. Om en hel platta förkastas kan det bli svårare att utvärdera och särskilja observerade effekter, särskilt om den förkastade plattan är en platta för lösningsmedelskontroll eller en platta som innehåller behandlade embryon. I det första fallet måste testet upprepas. I det andra fallet förloras en eller flera hela behandlingsgrupper på grund av dödligheten i den interna kontrollen, vilket i sin tur kan påverka möjligheterna att utvärdera effekter och bestämma LC_{50} värden.

23. En positiv kontroll vid en fast koncentration på 4 mg/l 3,4-dikloranilin utförs med varje äggsats som används för testningen.

24. Om lösningsmedel används exponeras en ytterligare grupp på 20 embryon för lösningsmedlet i en separat 24-hålsplatta, vilken tjänar som lösningsmedelskontroll. För att testet ska anses acceptabelt bör det påvisas att lösningsmedlet inte har några signifikanta effekter på kläckningstid eller överlevnad, och inte heller framkallar några andra negativa effekter på embryona (jfr punkt 8c).

Inledning av exponering och testets varaktighet

25. Testet inleds så snart som möjligt efter det att äggen befruktats och avslutas efter 96 timmars exponering. Embryona bör nedsänkas i testlösningarna innan klyvningen av blastodisken inleds eller senast vid det 16:e cellstadiet. För att exponeringen ska kunna inledas med minsta möjliga försening väljer man slumpvis ut minst dubbelt så många ägg som behövs per behandlingsgrupp. Äggen överförs till de respektive koncentrationerna och kontrollerna (t.ex. i 100 ml kristalliseringsfat, äggen bör vara helt täckta) senast 90 minuter efter befruktning.

26. Livskraftiga befruktade ägg bör skiljas från obefruktade ägg och överföras till 24-hålsplattor som har förkonditionerats i 24 timmar och återfyllts med nyberedda testlösningar, 2 ml/hål, inom 180 minuter efter befruktning. Med hjälp av stereomikroskop (helst ≥ 30 gångers förstoring) väljer man sedan ut

▼M7

befruktade ägg som genomgår klyvning och inte uppvisar några uppenbara oregelbundenheter under klyvning (asymmetri, vesikelbildning) eller skador på den yttre fosterhinnan. För insamling av ägg och separation, se tillägg 3, figurerna 1 och 3, och tillägg 4, figur 2.

Fördelning av ägg mellan 24-hålsplattorna

27. Äggen fördelas mellan plattornas hål i följande antal (se även tillägg 4, figur 1):

— 20 ägg på en platta för varje testkoncentration.

— 20 ägg som lösningsmedelskontroll på en platta (om nödvändigt).

— 20 ägg som positiv kontroll på en platta.

— 4 ägg i utspädningsvatten som intern kontroll av plattan på var och en av ovanstående plattor.

— 24 ägg i utspädningsvatten som negativ kontroll på en platta.

Observationer

28. De apikala observationer som utförs av varje testat embryo omfattar följande: embryonas koagulering, avsaknad av somitbildning, ej lossad svans och avsaknad av hjärtslag (tabell 1). Dessa observationer används för att bestämma dödligheten enligt följande: Ett positivt resultat i en av observationerna innebär att sebrafiskembryot är dött. Dessutom registreras kläckning i behandlings- och kontrollgrupperna dagligen, med början efter 48 timmar. Observationerna registreras var 24:e timme fram till slutet av testet.

Tabell 1

Apikala observationer av akut toxicitet hos sebrafiskembryon 24–96 timmar efter befruktning.

	Exponeringstider			
	24 tim	48 tim	72 tim	96 tim
Koagulerade embryon	+	+	+	+
Avsaknad av somitbildning	+	+	+	+
Ej lossad svans	+	+	+	+
Avsaknad av hjärtslag		+	+	+

29. *Koagulering av embryot:* Koagulerade embryon är mjölkvita och ser mörka ut i mikroskopet (se tillägg 5, figur 1). Antalet koagulerade embryon bestäms efter 24, 48, 72 och 96 timmar.

30. *Avsaknad av somitbildning:* Vid 26 ± 1 °C har cirka 20 somiter bildats efter 24 timmar (se tillägg 5, figur 2) hos ett sebrafiskembryo med normal utveckling. Ett normalt utvecklat embryo visar spontana rörelser (sammandragningar från sida till sida). Spontana rörelser visar att somiter bildas. Avsaknad av somiter registreras efter 24, 48, 72 och 96 timmar. Avsaknad av somitbildning efter 24 timmar kan bero på en allmän försening i utvecklingen. Somiter bör bildas senast efter 48 timmar. Om så inte sker anses embryona vara döda.

31. *Ej lossad svans:* Hos ett normalt utvecklat sebrafiskembryo observeras avlossning av svansen (se tillägg 5, figur 3) från äggulan efter bakre töjning av

▼M7

embryokroppen. Ej lossad svans registreras efter 24, 48, 72 och 96 timmar.

32. *Avsaknad av hjärtslag:* Hos normalt utvecklade sebrafiskembryon vid 26 ± 1 °C syns hjärtslagen efter 48 timmar (se tillägg 5, figur 4). Särskild försiktighet bör iakttas vid registreringen av denna endpoint eftersom oregelbundna (onormala) hjärtslag *inte* bör registreras som en dödlig effekt. Synliga hjärtslag utan cirkulation i aorta abdominalis anses inte vara dödligt. För att registrera denna endpoint bör embryon som inte uppvisar hjärtslag observeras med minst 80x förstoring i minst en minut. Avsaknad av hjärtslag registreras efter 48, 72 och 96 timmar.

33. Kläckningsgraden för alla behandlings- och kontrollgrupper bör registreras från 48 timmar och framåt och rapporteras. Även om kläckning inte är en endpoint som används för beräkning av LC_{50} säkerställer kläckningen att embryot exponeras utan att eventuellt hindras av den yttre fosterhinnan, och kan därför vara till hjälp i tolkningen av data.

34. Detaljerade beskrivningar av normal utveckling (35) och exempel på onormal utveckling av sebrafiskembryon ges i tilläggen 3 och 5.

Analysmätningar

35. I början och i slutet av testet mäts pH, total hårdhet och ledningsförmåga i kontrollgruppen (kontrollgrupperna) och i den högsta koncentrationen av testkemikalien. I semistatiska förnyelsesystem bör pH mätas före och efter förnyelse. Koncentrationen av upplöst syrgas mäts i slutet av testet i negativa kontroller och i den högsta testkoncentrationen med livskraftiga embryon, där den ska överensstämma med testets giltighetskriterierna (se punkt 8f). Om det finns risk för temperaturvariationer mellan 24-hålsplattorna mäts temperaturen i tre slumpmässigt utvalda kärl. Temperaturen bör helst registreras kontinuerligt under testet eller åtminstone dagligen.

36. I ett statiskt system bör koncentrationen av testkemikalien mätas åtminstone i de högsta och lägsta testkoncentrationerna, men helst i alla behandlingar, i början och slutet av testet. Vid semistatiska test (förnyelsetest) där det förväntas att testkemikaliekoncentrationen kommer att hållas inom ± 20 % av de nominella värdena är det tillrådligt att analysera de högsta och lägsta testkoncentrationerna åtminstone när de är nyberedda och strax före förnyelsen. Vid test där testkemikaliens koncentration inte förväntas hållas inom ± 20 % av den nominella koncentrationen måste alla testkoncentrationer analyseras, när de är nyberedda och omedelbart före förnyelse. Om det inte finns en tillräcklig volym för analysen kan det vara lämpligt att använda ersättningsbehållare av samma material och med samma förhållande mellan volym och ytarea som 24-hålsplattor. Det rekommenderas starkt att resultaten baseras på de uppmätta koncentrationerna. När koncentrationerna inte håller sig inom 80–120 % av den nominella koncentrationen bör effektkoncentrationerna uttryckas i förhållande till de uppmätta koncentrationernas geometriska medelvärde (se kapitel 5 i OECD:s vägledningsdokument nr 23 om akvatisk toxicitetstestning av svåra ämnen och blandningar för närmare uppgifter (28).

LIMIT-TEST

37. Genom användning av de förfaranden som beskrivs i denna testmetod kan ett så kallat limit-test göras upp till 100 mg/l testkemikalie eller upp till kemikaliens löslighetsgräns i testmediet (den av dessa koncentrationer som är lägst) för att visa att LC_{50} är högre än denna koncentration. Limit-test bör utföras med 20 embryon i behandlingen, i den positiva kontrollen och om nödvändigt i lösningsmedelskontrollen. I den negativa kontrollen bör 24

▼M7

embryon användas. Om procentandelen dödlighet i den testade koncentrationen överstiger dödligheten i den negativa kontrollen (eller lösningsmedelskontrollen) med 10 % bör en fullständig undersökning göras. Eventuella observerade effekter bör registreras. Om dödligheten överstiger 10 % i den negativa kontrollen (eller lösningsmedelskontrollen) blir testet ogiltigt och bör göras om.

DATA OCH RAPPORTERING

Behandling av resultaten

38. I detta test anses de individuella hålen vara oberoende replikat för statistisk analys. Procentandelen embryon för vilka minst en av de apikala observationerna är positiv vid 48 och/eller 96 timmar plottas mot testkoncentrationerna. Lämpliga statistiska metoder (38) bör användas för att beräkna kurvornas lutningar, LC_{50}-värden och konfidensgränser (95 %) och OECD:s vägledningsdokumentet *Current Approaches to Statistical Analysis of Ecotoxicity Data* bör konsulteras (39).

Testrapport

39. Testrapporten ska innehålla följande information:

Testkemikalie:

Monokomponentämne:

— fysiskt utseende, vattenlöslighet och ytterligare relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper,

— kemiska beteckningar, såsom IUPAC- eller CAS-beteckning, CAS-nummer, SMILES- eller InChI-kod, strukturformel, renhet, kemisk beteckning på orenheter i förekommande fall och om möjligt osv. (inklusive organisk kolhalt i förekommande fall),

Multikomponentämne, UVCB-ämne och blandning:

— karakteriseras så långt som möjligt genom kemisk beteckning (se ovan), kvantitativ förekomst och relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper hos beståndsdelarna.

Testorganismer:

— vetenskapligt namn, stam, härkomst och metod för insamling av befruktade ägg och efterföljande hantering.

Testbetingelser:

— använt testförfarande (t.ex. semistatisk förnyelse),

— fotoperiod,

— testets utformning (t.ex. antal testbehållare, typer av kontroller),

— kvaliteten på det vatten som fisken hålls i (t.ex. pH, hårdhet, temperatur, ledningsförmåga, upplöst syre),

— koncentration av upplöst syre, pH, total hårdhet, temperatur och ledningsförmåga för provlösningarna i början och efter 96 timmar,

— metod för beredning av stamlösningar och testlösningar samt förnyelsefrekvens,

▼M7

— motivering för användning av lösningsmedel och valet av lösningsmedel, om annat än vatten,

— nominella testkoncentrationer och resultatet av alla analyser för att bestämma koncentrationen av testkemikalien i testkärlen, metodens återhämtningskapacitet och kvantifieringsgräns (LoQ) bör också rapporteras,

— bevis för att kontrollerna uppfyller de allmänna giltighetskriterierna för överlevnad,

— äggens befruktningsgrad,

— kläckningsgrad i behandlings- och kontrollgrupperna.

Resultat:

— högsta koncentration som inte orsakar dödlighet under testets varaktighet,

— minsta koncentration orsakar 100 % dödlighet under testets varaktighet,

— kumulativ dödlighet för varje koncentration vid de rekommenderade observationstiderna,

— LC_{50}-värden efter 96 timmar (och eventuellt efter 48 timmar) för dödlighet med 95 % konfidensintervall, om möjligt,

— diagram över koncentrations-dödlighetskurvan i slutet av testet,

— dödlighet i kontrollerna (negativa kontroller, interna kontroller av plattan samt positiv kontroll och eventuella lösningsmedelskontroller,

— data om resultatet av var och en av de fyra apikala iakttagelserna,

— förekomst och beskrivning av morfologiska och fysiologiska abnormiteter, om några (se exempel i tillägg 5, figur 2),

— händelser under testet som kan påverka resultatet,

— statistisk analys och behandling av data (probitanalys, logistisk regressionsmodell och geometriskt medelvärde för LC_{50}),

— lutning och konfidensintervall för regressionen av den (transformerade) koncentrations-responskurvan,

Eventuella avvikelser från testmetoden och relevanta förklaringar.

Diskussion och tolkning av resultaten.

LITTERATUR

(1) OECD (2011) Validation Report (Phase 1) for the Zebrafish Embryo Toxicity Test: Del I och II. Series on Testing and Assessment nr 157, OECD, Paris.

(2) OECD (2012) Validation Report (Phase 2) for the Zebrafish Embryo Toxicity Test: Del I och II (bilagor). Series on Testing and Assessment nr 179, OECD, Paris.

(3) Braunbeck, T., Böttcher, M., Hollert, H., Kosmehl, T., Lammer, E., Leist, E., Rudolf, M. och Seitz, N. (2005) Towards an alternative for the acute

▼M7

fish 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) Internationella standardiseringsorganisationen.

(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. och 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*). Doktorsavhandling, Tekniska universitetet i Dresden, Tyskland.

(8) Lange, M., Gebauer, W., Markl, J. och 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. och 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. och 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. och 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. och 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. och 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. och 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) Kapitel C.4 i denna bilaga: Bestämning av ”lätt” bionedbrytbarhet.

(18) Kapitel C.29 i denna bilaga: Lätt bionedbrytbarhet – CO_2 i förslutna kärl (headspace-test).

(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) Incardonai, 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 denna bilaga: Korttidstest av reproduktion hos fisk. Se tillägg 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) International Standards. Water quality – Determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)]. ISO 7346-3: Genomflödesmetoden. Finns på [http://www.iso.org].

(28) OECD (2000) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Series on Testing and Assessment nr 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*). Femte upplagan. 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) Europeiska kommissionen (2007): Kommissionens rekommendation 2007/526 / EG av den 18 juni 2007 om riktlinjer för hållande och skötsel av djur som används för försök och andra vetenskapliga ändamål (delgivet med nr C (2007) 2525) [http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2007:197:0001:0089:SV:PDF]

(33) Europeiska unionen (2010): Europaparlamentets och rådets direktiv 2010/63/EU av den 22 september 2010 om skydd av djur som används för vetenskapliga ändamål. EUT L 276, 20.10.2010, s. 33.

http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2010:276:0033:0079:SV: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. och Schilling, T.F. (1995) Stages of embryonic development of the zebrafish. Dev. Dyn. 203: 253–310.

(36) Kapitel C.2 i denna bilaga: Test av akut immobilisering av *Daphnia*-arter.

(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) Internationell standard Water quality – Guidance on statistical interpretation of ecotoxicity data ISO TS 20281. Finns på [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 nr 54. OECD, Paris.

(40) Braunbeck, T., Lammer, E., 2006. Detailed review paper ”Fish embryo toxicity assays”. UBA-rapport enligt kontrakt nr 20385422, tyska federala miljömyndigheten, Berlin. s. 298 ff.

▼M7

Tillägg 1

DEFINITIONER

Apikal endpoint: orsakar effekter på populationsnivå.

Blastula: En cellbildning kring djurets pol som täcker en viss del av gulan.

Kemikalie: ett ämne eller en blandning.

Epiboli: en massiv förökning av främst överhudceller i embryots gastrulafas och embryots rörelse från rygg- till buksidan, varigenom entodermala cellager internaliseras i en invagineringsliknande process och gulan införlivas i embryot.

Genomflödestest: test med ett kontinuerligt flöde av testlösningar genom testsystemet under exponeringens varaktighet.

Intern kontroll av plattan: intern kontroll som utförs genom att fyra hål per 24-hålsplatta fylls med utspädningsvatten för att identifiera eventuell förorening av plattorna som orsakats av tillverkaren eller forskaren under förfarandet och eventuella effekter av plattan som kan påverka testresultatet (t.ex. temperaturstigning).

IUPAC: Internationella kemiunionen (*International Union of Pure and Applied Chemistry*).

Underhållsvatten: det vatten där de vuxna fiskarna hålls.

Genomsnittlig dödlig koncentration (LC_{50}): den koncentration av testkemikalien som uppskattas vara dödlig för 50 % av testorganismerna under testperioden.

Semistatiskt testförfarande med regelbunden förnyelse av testlösning: test med regelbunden förnyelse av testlösningar vid fastställda perioder (t.ex. var 24:e timme).

SMILES: Simplified Molecular Input Line Entry Specification.

Somit: hos utvecklande vertebratembryon är somiter massor av mesoderm som är lateralt fördelade till neuralröret och så småningom utvecklar läderhud (dermatom), skelettmuskler (myotom) och revben (sklerotom).

Statiskt test: ett test där testlösningarna förblir oförändrade under hela testet.

Testkemikalie: alla ämnen eller blandningar som testas med denna testmetod.

UVCB-ämne: ämne med okänd eller varierande sammansättning, komplexa reaktionsprodukter eller biologiskt material.

▼M7

Tillägg 2

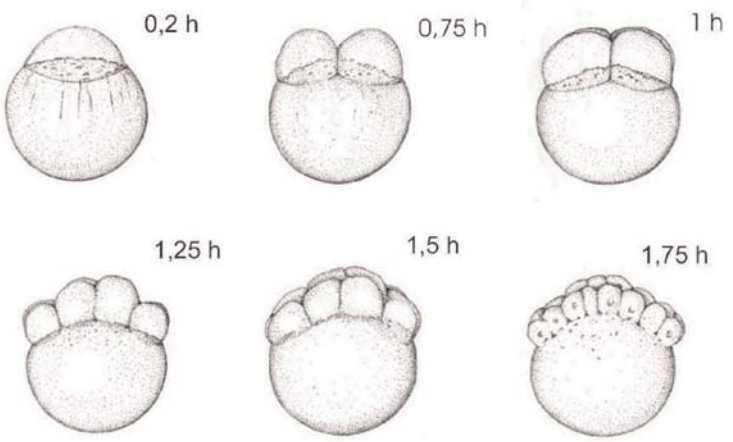
UNDERHÅLL, UPPFÖDNING OCH TYPISKA FÖRHÅLLANDEN FÖR AKUT TOXICITETSTEST AV SEBRAFISKEMBRYON

		Sebrafisk (*Danio rerio*)
Arternas ursprung		Indien, Burma, Malacka, Sumatra
Könsdimorfism		Honor: utskjutande mage när de bär ägg. Hanar: slankare, orange nyans mellan blå längsgående ränder (särskilt tydligt vid analfenan).
Utfodring		Torrflingfoder (max. 3 % fiskens vikt per dag) 3–5 gånger dagligen, dessutom naupliuslarver av saltkräftor (*Artemia*) och/eller små hinnkräftor (*Daphnia*) av lämplig storlek från en oförorenad källa. Utfodring med levande foder innebär en miljöberikning och levande foder bör därför ges när så är möjligt. För att garantera optimal vattenkvalitet bör matrester och avföring avlägsnas cirka en timme efter utfodring.
Ungefärlig vikt för en vuxen fisk		Honor: 0,65 ± 0,13 g Hanar: 0,5 ± 0,1 g
Underhåll av föräldrafiskar	Belysning	Fluorescerande lampor (brett spektrum), 10–20 µE/m^2/s, 540–1080 lux, eller 50–100 ft-c (liknande ljuset i laboratoriet), 12–16 timmars ljusperiod.
	Vattentemperatur	26 ± 1 °C.
	Vattenkvalitet	O_2 ≥ 80 % mättnad, hårdhet: t.ex. ~30–300 mg/l $CaCO_3$, NO_3^-: ≤ 48 mg/l, NH_4^+ och NO_2^-: < 0,001 mg/l, restklor < 10 µg/l, totalt organiskt klor < 25 ng/l, pH = 6,5–8,5.
	Ytterligare kriterier för vattenkvalitet	Partiklar < 20 mg/l, totalt organiskt kol < 2 mg/l, total mängd bekämpningsmedel som innehåller organiska fosforföreningar < 50 ng/l, total mängd bekämpningsmedel som innehåller organiska klorföreningar plus polyklorerade bifenyler < 50 ng/l.
	Tankstorlek för underhåll	t.ex. 180 liter, 1 fisk/l.
	Vattenrening	Permanent (kolfiltrerad), andra möjligheter är kombinationer med semistatiskt förnyelseunderhåll eller genomflödessystem med kontinuerlig vattenförnyelse.
	Rekommenderad kvot hanar/honor för uppfödning	2:1 (eller masslek).
Lektankar		T.ex. 4-literstankar utrustade med stålnätbotten och konstgjorda växter som lekstimulans, externa värmemattor eller masslek i underhållstankar.
Äggens struktur och utseende		Stabil yttre fosterhinna (dvs. mycket transparent, ej klibbig, diameter ~ 0,8–1,5 mm).
Äggläggning		En enda mogen hona lägger minst 50–80 ägg per dag. Beroende på stam kan antalet ägg vara avsevärt högre. Befruktningsgraden bör vara ≥ 70 %. För fisk som leker första gången kan äggens befruktningsgrad vara lägre vid de första äggläggningstillfällena.
Testtyp		Statisk, semistatisk förnyelse, genomflöde, 26 ± 1 °C, 24-timmars konditionerade testbehållare (t.ex. 24-hålsplattor, 2,5–5 ml per hål).

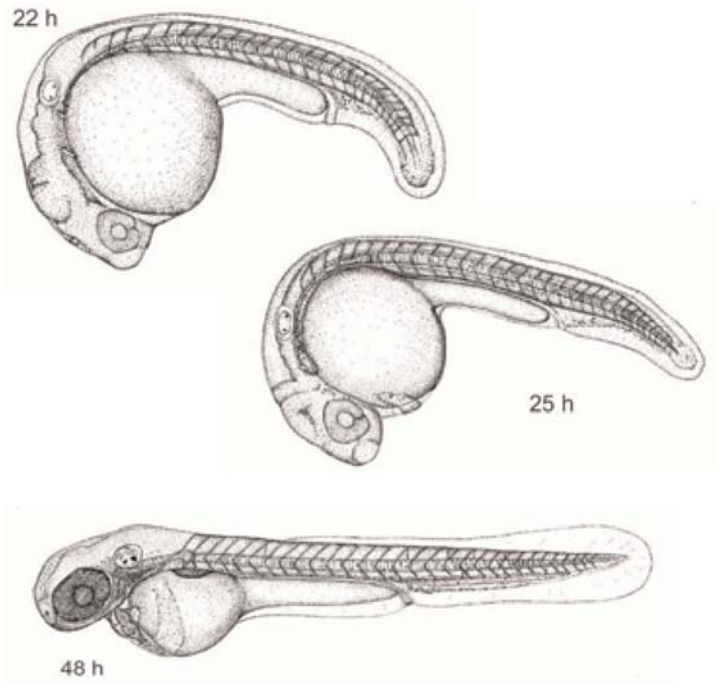
▼M7

Tillägg 3

NORMAL UTVECKLING AV SEBRAFISK VID 26 °C

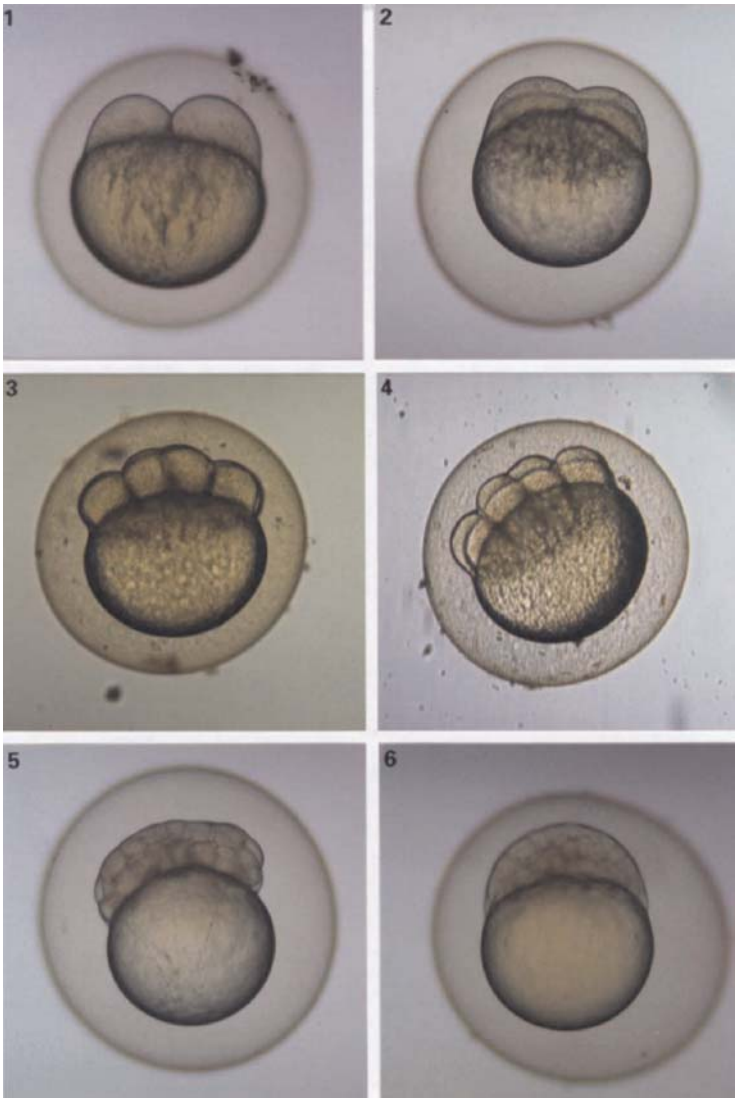


Figur 1: Valda tidiga utvecklingsstadier för sebrafisk (***Danio rerio***): 0,2–1,75 timmar efter befruktning (från Kimmel m.fl., 1995 (35)). Tidssekvensen för normal utveckling kan användas för att fastställa både befruktning och äggens livskraft (se punkt 26: Urval av befruktade ägg).



Figur 2: Valda sena utvecklingsstadier för sebrafisk (*Danio rerio*) (embryona tas ur den yttre fosterhinnan för optimerad synlighet): 22–48 timmar efter befruktning (från Kimmel m.fl., 1995 (35)).

▼M7



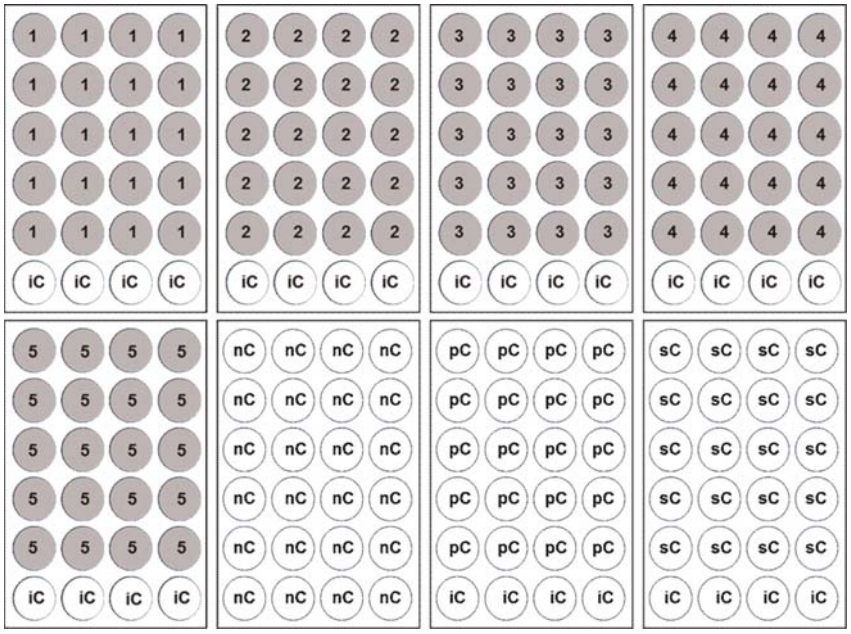
Figur 3: Normal utveckling för sebrafiskembryon (*Danio rerio*): 1) 0,75 tim., 2-cellstadiet, 2) 1 tim., 4-cellstadiet, 3) 1,2 tim., 8-cellstadiet, 4) 1,5 tim., 16-cellstadiet, 5) 4,7 tim. epiboli inleds, 6) 5,3 tim., cirka 50 % epiboli (från Braunbeck & Lammer 2006 (40)).

▼M7

Tillägg 4

Figur 1

Utformning av 24-hålsplattor



1–5 = fem testkoncentrationer/kemikalie,

nC = negativ kontroll (utspädningsvatten),

iC = intern kontroll av plattor (utspädningsvatten),

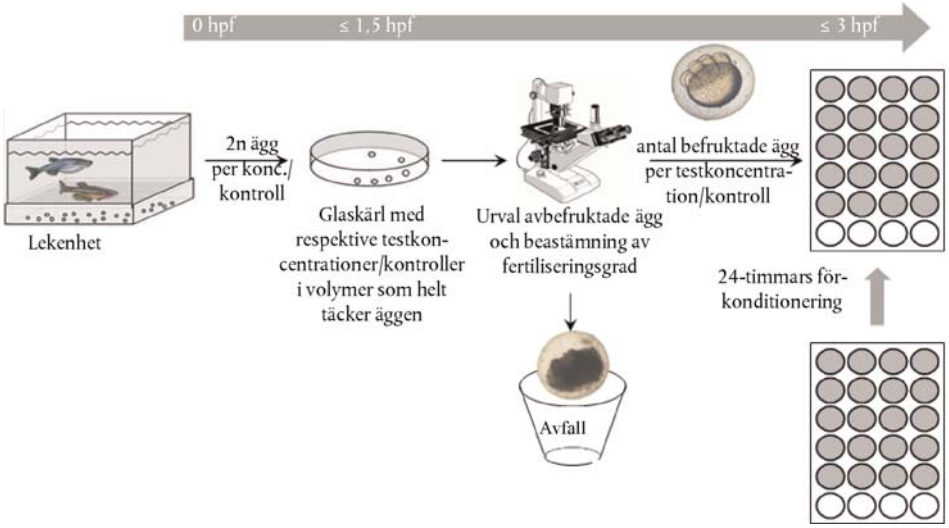
pC = positiv kontroll (3,4-DCA 4mg/l),

sC = lösningsmedelskontroll.

▼M7

Figur 2

Översikt av testförfarandet för akut toxicitet hos sebrafiskembryon (från vänster till höger): äggproduktion, insamling av ägg, förexponering omedelbart efter befruktning i glaskärl, urval av befruktade ägg med inverterat mikroskop eller kikare, samt fördelning av befruktade ägg till 24-hålsplattor som förberetts med respektive testkoncentrationer/kontroller, n = antal ägg som krävs per teskoncentration/kontroll (här 20), hpf = timmar efter befruktning.



▼M7

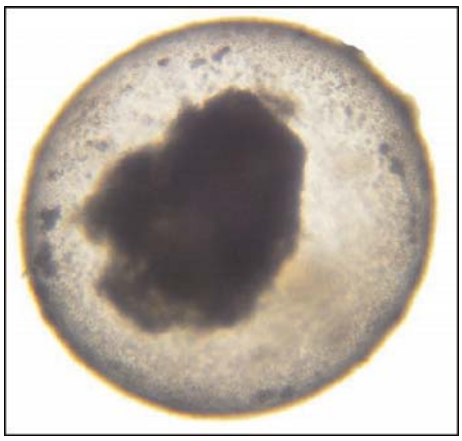
Tillägg 5

ÖVERSIKT AV DÖDLIGA ENDPOINTS FÖR AKUT TOXICITETSTEST HOS SEBRAFISKEMBRYON.

Följande apikala endpoints indikerar akut toxicitet och därmed dödlighet för embryon: *koagulering av embryot, ej lossad svans, avsaknad av somitbildning och avsaknad av hjärtslag*. Följande mikroskopbilder har valts ut för att illustrera dessa endpoints:

Figur 1

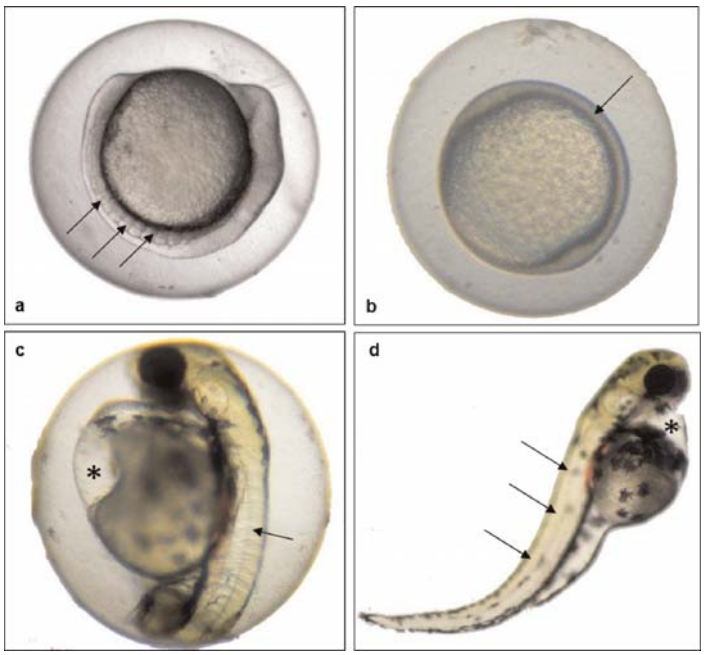
Koagulering av embryot:



I ljusfältsbelysning visar koagulerade sebrafiskembryon en variation av ogenomskinliga inneslutningar.

Figur 2

Avsaknad av somitbildning:

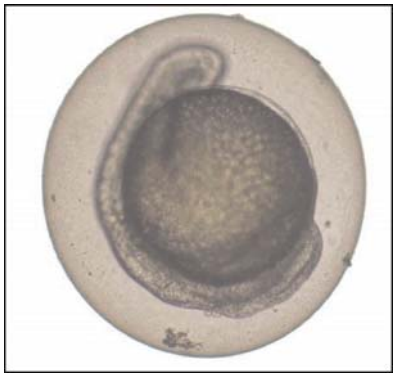


▼M7

Även om utvecklingen försenas med cirka 10 timmar visar det 24 timmar gamla sebrafiskembryot i a) välutvecklade somiter (→), medan embryot i b) inte visar några tecken på somitbildning (→). Även om det 48 timmar gamla sebrafiskembryot i c) har en uttalad blödning i gulesäcken (*) uppvisar det en annorlunda somitbildning (→), medan det 96 timmar gamla sebrafiskembryot som avbildas i d) inte visar några tecken på somitbildning (→). Notera också ryggradskrökningen (skolios) och blödningen i hjärtsäcken (*) hos det embryo som visas i d).

Figur 3

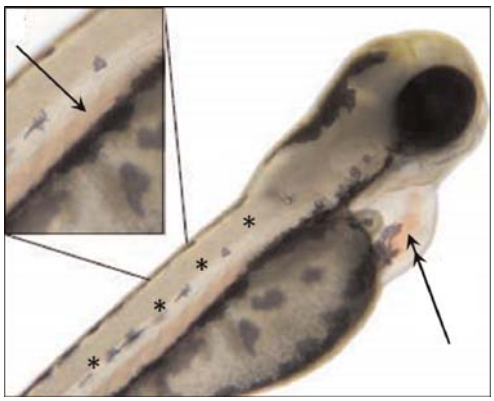
Ej avlossad svansknopp i sidovy



(a: →, 96 timmar gammalt sebrafiskembryo). Notera också avsaknaden av ögonknopp (*).

Figur 4

Avsaknad av hjärtslag



Avsaknad av hjärtslag är per definition svårt att illustrera i en mikroskopbild. Avsaknad av hjärtslag påvisas genom avsaknad av sammandragningar av hjärtat (dubbelpilen). Orörliga blodkroppar, t.ex. aorta abdominalis (→ insticksbilden) är inte en indikator på avsaknad av hjärtslag. Notera också avsaknaden av somitbildning hos detta embryo (*, homogent snarare än segmentellt utseende hos muskelvävnader). Observationstiden för att registrera avsaknad av hjärtslag bör vara minst en minut med en minsta förstoring på 80 x.

▼M7

C.50 TOXICITETSTEST UTAN SEDIMENT PÅ *MYRIOPHYLLUM SPICATUM*

INLEDNING

1. Denna testmetod motsvarar OECD:s testriktlinje 238 (2014). Den är utformad för att bedöma kemikaliers toxicitet för *Myriophyllum spicatum* (axslinga), en submers tvåhjärtbladig växt som hör till slingesläktet. Testet baseras på en befintlig ASTM-testmetod (1) som har modifierats till ett testsystem utan sediment (2) för att uppskatta testkemikaliernas inneboende ekotoxicitet (oberoende av testkemikaliens fördelningsbeteende mellan vatten och sediment). Testsystem utan sediment har en låg analytisk komplexitet (endast i vattenfasen) och resultaten kan analyseras parallellt och/eller jämföras med de resultat som erhölls i testet av flytbladsväxten *Lemna* sp. (3). Eftersom testet kräver sterila förhållanden kan man dessutom begränsa effekterna av mikroorganismer och alger (kemisk upptagning/nedbrytning osv.) i så stor utsträckning som möjligt. Detta test ersätter inte andra akvatiska toxicitetstester, utan bör snarare komplettera dessa tester för att möjliggöra en mer fullständig risk- och farobedömning för vattenväxter. Testmetoden har validerats i en provningsjämförelse (4).

2. Dokumentet innehåller ingående beskrivningar av testförfaranden med regelbunden förnyelse av testlösningar (semistatiskt test) och utan förnyelse av testlösningar (statiskt test). Beroende på lagstadgade krav och syftet med testet rekommenderas användning av ett semistatiskt testförfarande, t.ex. för ämnen som snabbt försvinner ur lösningen genom avdunstning, adsorption, ljusnedbrytning, hydrolys, utfällning eller biologisk nedbrytning. Närmare vägledning finns i (5). Denna testmetod gäller ämnen för vilka testmetoden har validerats (närmare uppgifter finns i rapporten från provningsjämförelsen (4)), beredningar eller kända blandningar. Om en blandning testas bör dess beståndsdelar identifieras och kvantifieras så långt som möjligt. Testmetoden utan sediment på *Myriophyllum spicatum* kompletterar toxicitetstestet med vatten–sediment på *Myriophyllum spicatum* (6). Innan testmetoden för lagstadgad testning av en blandning används bör man överväga om, och i så fall varför, den kommer att ge godtagbara resultat för det syftet. Sådana överväganden är inte nödvändiga om blandningen måste provas enligt lag.

TESTPRINCIP

3. Kontinuerligt växande plantkulturer av *Myriophyllum spicatum* (endast i ett modifierat Andrewsmedium, se tillägg 2) får växa som monokulturer i olika koncentrationer av testkemikalien under en period av 14 dagar i ett testsystem utan sediment. Syftet är att genom bestämning av utvalda mätvariabler kvantifiera testkemikaliens effekter på tillväxten under tiden för testets genomförande. Mätvariabler är skottens tillväxt i längd, sidogrenar och rötter samt utveckling av färsk- och torrvikt och ökning av kransar. Dessutom tas hänsyn till utmärkande kvalitativa förändringar hos testorganismerna, t.ex. missformning eller kloros och nekros, som visar sig genom en gulnande eller vit och brun färg. För att kvantifiera testkemikaliens effekter jämförs tillväxten i testlösningarna med tillväxten i kontrollerna. Därefter bestäms den koncentration som åstadkommer en bestämd procent (x) av tillväxthämning. Denna koncentration betecknas som EC_x, där värdet ”x” beror på vilka lagstadgade krav som gäller, t.ex. EC_{10}, EC_{20}, EC_{50}. Det bör noteras att uppskattningarna av värdena EC_{10} och EC_{20} endast är tillförlitliga och lämpliga för tester där kontrollväxternas variationskoefficienter faller under den uppskattade effektnivån, dvs. variationskoefficienterna bör vara < 20 % för en stabil uppskattning av ett EG_{20}-värde.

4. Både genomsnittlig specifik tillväxtgrad (uppskattas genom bedömningar av huvudskottets längd och ytterligare tre mätvariabler) och producerad mängd biomassa (uppskattas genom en beräkning av ökningen av huvudskottets

▼M7

längd och ytterligare tre mätvariabler) hos obehandlade och behandlade plantor bör bestämmas. Specifik/a tillväxtgrad/er (r) och utbyte (y) används sedan för att bestämma E_rC_x (t.ex. E_rC_{10}, E_rC_{20}, E_rC_{50}) respektive E_yC_x (t.ex. E_yC_{10}, E_yC_{20}, E_yC_{50}).

5. Den lägsta koncentrationen med observerad effekt (LOEC) och den högsta koncentrationen utan observerad effekt (NOEC) kan också bestämmas statistiskt.

INFORMATION OM TESTKEMIKALIEN

6. Man bör ha tillgång till en analysmetod som är tillräckligt känslig för kvantitetsbestämning av testkemikalien i testmediet. Bland annat följande uppgifter om testkemikalien kan vara av värde när man fastställer testbetingelserna: strukturformel, renhetsgrad och föroreningsgrad, vattenlöslighet, stabilitet i vatten och ljus, syradissociationskonstant (pK_a), fördelningskoefficient oktanol/vatten (K_{ow}), ångtryck och biologisk nedbrytbarhet. Löslighet i vatten och ångtryck kan användas för att beräkna Henrys konstant, som visar om det är sannolikt att förlusterna av testkemikalien under tiden för testets genomförande kommer att vara betydande. Detta ger en indikation på om man behöver vidta åtgärder för att kontrollera dessa förluster. Om uppgifterna om testkemikaliens löslighet och stabilitet är osäkra, bör man bedöma dessa egenskaper under testbetingelserna, dvs. i det odlingsmedium, vid den temperatur och under de belysningsförhållanden som används i testet.

7. pH-kontrollen av testmediet är särskilt viktig, t.ex. när man testar metaller eller ämnen som är hydrolytiskt instabila. Närmare vägledning för testning av kemikalier vars fysikalisk-kemiska egenskaper gör dem svåra att testa finns i OECD:s vägledningsdokument (5).

TESTETS GILTIGHET

8. För att testet ska vara giltigt måste fördubblingstiden för huvudskottets längd i kontrollen vara mindre än 14 dagar. Med testmedier och testbetingelser som beskrivs för den aktuella testmetoden kan detta kriterium uppfyllas med ett statiskt eller semistatiskt testförfarande.

9. Den genomsnittliga variationskoefficienten för utbyte baserat på mätningar av skottens färskvikt (dvs. från början till slutet av testet) och ytterligare mätvariabler (se punkt 37) i kontrollkulturerna får inte överskrida 35 % mellan replikaten.

10. Mer än 50 % av replikaten i kontrollgruppen hålls sterila under den 14 dagar långa exponeringstiden, vilket innebär att de är fria från synliga föroreningar av andra organismer såsom alger, svampar och bakterier (klar lösning). *Anmärkning:* Vägledning om sterilitetsbedömning ges i rapporten från provningsjämförelsen (4).

REFERENSKEMIKALIE

11. Referenskemikalier, t.ex. 3,5-diklorfenol som används i provningsjämförelsen (4), kan testas som ett sätt att kontrollera testförfarandet. Enligt data från provningsjämförelsen ligger de genomsnittliga EG_{50}-värdena av 3,5-DCP för olika responsvariabler (se punkterna 37–41 i denna testmetod) mellan 3,2 mg/l och 6,9 mg/l (se rapporten om provningsjämförelsen för information om konfidensintervall för dessa värden). Det är lämpligt att testa en referenskemikalie minst två gånger per år eller, om testen utförs mer sällan, parallellt med fastställandet av en testkemikalies toxicitet.

▼M7

BESKRIVNING AV TESTMETODEN

Utrustning

12. All utrustning som befinner sig i kontakt med testmedier ska vara av glas eller annat kemiskt inert material. Glasutrustning som används för odling och test ska vara rengjord från kemiska föroreningar som kan läcka in i testmediet, och glaset ska vara sterilt. Testkärlen bör vara tillräckligt långa för att skotten i kontrollkärlen under vattenfasen ska kunna växa utan att nå testmediets yta i slutet av testet. Glasprovrör med tjocka väggar av borosilikatglas utan pip med en innerdiameter på cirka 20 mm, en längd på cirka 250 mm och aluminiumlock rekommenderas.

13. Eftersom det modifierade Andrewsmediet innehåller sackaros (som stimulerar tillväxten av svampar och bakterier) måste testlösningarna framställas under sterila förhållanden. Alla vätskor samt utrustning steriliseras före användning. Sterilisering sker genom varmluftsbehandling (210 °C) i fyra timmar eller autoklavering i 20 minuter vid 121 °C. Dessutom ska alla kolvar, tallrikar, skålar osv. och annan utrustning genomgå flambehandling på en steril arbetsbänk strax före användning.

14. Kulturer och provkärl får inte förvaras tillsammans. Bäst är att använda separata klimatodlingskammare, inkubatorer eller klimatrum. Belysning och temperatur bör kunna regleras och hållas på konstant nivå.

Testorganism

15. *Myriophyllum spicatum* (axslinga) – en submers tvåhjärtbladig växt – hör till slingesläktet. Mellan juni och augusti sticker nästan omärkliga rosa-vita blommor upp ovanför vattenytan. Växterna är rotade i botten genom ett system av robusta jordstammar och förekommer på hela norra halvklotet i näringsrika, ej förorenade och kalkrika stillastående vatten med lerigt substrat. Axslinga föredrar sötvatten, men förekommer även i bräckt vatten.

16. För toxicitetstest utan sediment krävs sterila växter. Om testlaboratoriet inte har regelbundna axslingekulturer kan sterilt växtmaterial erhållas från ett annat laboratorium. Icke-sterilt växtmaterial kan också samlas in från naturen eller tillhandahållas av en kommersiell leverantör. Om plantorna tas från naturen bör man göra en taxonomisk kontroll av arten. Om plantorna samlas in från naturen eller tillhandahålls av en kommersiell leverantör bör de steriliseras (1) och hållas i samma medium som används för testet under minst åtta veckor. Det får inte finnas några uppenbara kontaminationskällor på platser som används för insamling i naturen. Om axslinga samlas in från naturen är det viktigt att mycket noggrant fastställa att rätt art samlas in, särskilt i regioner där axslingan kan hybridisera med andra arter från slingesläktet. Växtmaterial som införskaffas från andra laboratorier ska förvaras under minst tre veckor på samma sätt som plantor från naturen. Om ursprunget är känt ska detta alltid redovisas för växtmaterialet och de arter som används för testet.

17. Kvaliteten och enhetligheten hos plantorna som används för testet har stor betydelse för testresultatet, och de bör därför väljas ut med omsorg. Man bör använda unga, snabbväxande plantor utan synliga skador eller missfärgningar (p.g.a. kloros). Uppgifter om beredningen av testorganismen ges i tillägg 4.

Odling

18. För att göra odlingen mindre arbetskrävande – t.ex. när inga tester av axslinga är inplanerade under en längre tid – kan kulturerna förvaras i reducerad belysning och temperatur (50 μE m^{-2} s^{-1}, 20 ± 2 °C). Uppgifter om odling finns i tillägg 3.

▼M7

19. Minst 14–21 dagar före testet förs en tillräcklig mängd testorganismer aseptiskt över till färskt medium och odlas under 14–21 dagar under testbetingelser som en förkultur. Uppgifter om beredning av en förkultur ges i tillägg 4.

Testmedium

20. Endast ett näringsmedium rekommenderas för *Myriophyllum spicatum* i ett testsystem utan sediment, enligt beskrivningen i tillägg 2. En modifiering av Andrews medium rekommenderas för odling och testning med *Myriophyllum spicatum*, enligt beskrivningen i (1). Det modifierade Andrewsmediet fås fram med fem separat beredda näringsstamlösningar med 3 % sackaros. Uppgifter om beredning av mediet ges i tillägg 2.

21. För att få fram testlösningarna krävs ett tiofaldigt koncentrerat modifierat Andrewsmedium (i förekommande fall genom utspädning) Sammansättningen hos Andrews medium anges i tillägg 2.

Testlösningar

22. Testlösningarna bereds vanligtvis genom utspädning av en stamlösning. Stamlösningar av testkemikalien bereds normalt genom att kemikalien löses upp i demineraliserat (dvs. destillerat eller avjonat) vatten. Tillsats av näringsämnen sker med hjälp av det tiofaldigt koncentrerade modifierade Andrewsmediet.

23. Testkemikaliens stamlösningar kan steriliseras genom autoklav vid 121 °C i 20 minuter eller genom steril filtrering, förutsatt att den använda steriliseringstekniken inte denaturerar testkemikalien. Testlösningarna kan också beredas i sterilt demineraliserat vatten eller medier, under sterila förhållanden. Termostabilitet och adsorption på olika ytor bör beaktas i valet av förfarandet för att sterilisera testkemikaliens stamlösningar. Stamlösningarna bör därför beredas under sterila förhållanden, dvs. med användning av sterila material för upplösning av testkemikalien (t.ex. flamsterilisering, draghuvar med laminärt flöde osv.) i sterilt vatten. Denna teknik för beredning av sterila stamlösningar gäller både ämnen och blandningar.

24. Den högsta koncentrationen av testkemikalien bör normalt inte överskrida dess vattenlöslighet under testbetingelserna. För testkemikalier med låg vattenlöslighet kan det vara nödvändigt att bereda en koncentrerad stamlösning eller en dispersion med hjälp av ett organiskt lösningsmedel eller dispergeringsmedel för att underlätta tillsatsen av exakta mängder testkemikalie i testmediet och bidra till dispergeringen och upplösningen av kemikalien. Man bör därför så långt som möjligt undvika att använda sådana ämnen. Det får inte uppstå fytotoxicitet på grund av att man tvingas använda lösnings- eller dispergeringsmedel för att bereda testlösningen. Exempel på vanliga lösningsmedel som inte förorsakar fytotoxicitet vid koncentrationer upp till 100 µl/l är aceton och dimetylformamid. Om ett lösnings- eller dispergeringsmedel används bör dess slutkoncentration redovisas och hållas så låg som möjligt (≤ 100 µl/l). Alla test- och kontrollösningar bör ha samma koncentration av lösnings- eller dispergeringsmedel. Mer information om användningen av dispergeringsmedel finns i (5).

Test- och kontrollgrupper

25. Förkunskap om testkemikaliens toxicitet för *Myriophyllum spicatum*, erhållen genom ett preliminärt test av koncentrationsintervallet för toxiciteten, underlättar valet av lämpliga testkoncentrationer. I det slutliga toxicitetstestet bör det i regel finnas fem (precis som i testet av tillväxthämning hos *Lemna sp.*, se kapitel C.26 i denna bilaga) till sju testkoncentrationer som är arrangerade i geometriska serier.

▼M7

De bör väljas så att NOEC och EC_{50}-värdena ligger innanför koncentrationsintervallet (se nedan). Separationsfaktorn mellan testkoncentrationerna bör inte överskrida 3,2, men om dos-respons-kurvan är flack kan en större separationsfaktor användas. Om färre än fem koncentrationer används måste detta motiveras. Minst fem replikat ska användas för respektive testkoncentration.

26. När man fastställer intervallet av testkoncentrationer (för det preliminära testet eller för det slutliga toxicitetstestet), ska man beakta följande:

För att bestämma en EC_x-koncentration ska värdet på EC_x ligga innanför intervallet för testkoncentrationerna för att man ska uppnå en lämplig konfidensgrad. Om man t.ex. ska bestämma EC_{50} ska den högsta testkoncentrationen vara högre än värdet på EC_{50}. Om värdet på EC_{50} ligger utanför intervallet för testkoncentrationerna blir motsvarande konfidensintervall stora, och det kan då bli omöjligt att korrekt bedöma modellens statistiska lämplighet.

Om syftet är att bestämma LOEC eller NOEC ska den lägsta testkoncentrationen vara så låg att tillväxten inte är märkbart mindre än tillväxten i kontrollen. Den högsta testkoncentrationen ska vara så hög att tillväxten är märkbart lägre än i kontrollen. Om dessa villkor inte är uppfyllda måste testet göras om med ett annat koncentrationsintervall (såvida inte den högsta koncentrationen ligger på löslighetsgränsen eller är lika med den högsta erforderliga gränskoncentrationen, t.ex. 100 mg/l).

27. Varje test bör inkludera kontroller som består av samma näringsämnesmedium, testorganismer (välj växtmaterial som är så enhetligt som möjligt, färska sidogrenar från förkulturer som kortas till 2,5 cm från basen), miljöförhållanden och förfaranden som testkärlen, men utan testkemikalien. Om ett lösnings- eller dispergeringsmedel används som hjälpmedel i testet krävs ytterligare en kontrollbehandling, nu med samma koncentration av lösnings- eller dispergeringsmedlet som i provkärlen med testkemikalien. Antalet replikat bör vara minst tio kontrollkärl (och lösningsmedelskärl om tillämpligt).

28. Om NOEC inte behöver bestämmas kan man ändra testupplägget så att antalet koncentrationer ökas medan antalet replikat per koncentration minskas. Antalet kontrollreplikat bör i alla händelser vara minst tio.

Exponering

29. Färska sidogrenar från förkulturen, avkortade till 2,5 från basen, fördelas slumpmässigt mellan testkärlen under aseptiska förhållanden. Varje testkärl bör innehålla en sidogren på 2,5 cm som bör ha ett spetsmeristem i ena änden. Det valda växtmaterialet bör vara av samma kvalitet i varje testkärl.

30. Provkärlen måste placeras slumpmässigt i inkubatorn för att minimera inflytandet av rumsbetingade skillnader i ljusintensitet och temperatur. Det krävs också blockvis fördelning eller slumpmässig omplacering av kärlen vid varje mättillfälle eller oftare.

31. Om ett preliminärt stabilitetstest visar att koncentrationen av testkemikalien inte kan upprätthållas (dvs. den uppmätta koncentrationen sjunker under 80 % av den uppmätta startkoncentrationen) under tiden för testets genomförande (14 dagar), bör ett semistatiskt testförfarande användas. I det fallet exponeras plantorna för nyberedda test- och kontrollösningar vid minst ett

▼M7

tillfälle under testet, t.ex. på dag 7. Intervallen för byte till färskt medium beror på stabiliteten hos testkemikalien. Det kan krävas kortare intervall för att upprätthålla nära nog konstanta koncentrationer av mycket instabila eller flyktiga kemikalier.

32. Exponering genom besprutning av bladen ingår inte i denna testmetod.

Testbetingelser

33. Belysning med varmt eller kallt vitt ljus från lysrör bör användas för att åstadkomma en ljusintensitet i intervallet 100–150 μE m^{-2} s^{-1}, varvid intensiteten mäts inom ett fotosyntetiskt aktivt våglängdsområde (400–700 nm) i punkter på samma avstånd från ljuskällan som testkärlens botten (motsvarande cirka 6 000–9 000 lux). Ljus-mörkerperioden ska vara 16:8 timmar. Metoden för detektering och mätning av ljuset, framför allt typen av ljussensor, påverkar mätvärdet. Sfäriska sensorer – som mäter ljuset från alla vinklar ovanför och under mätplanet – och sensorer av solsensortyp (med cosinuskoefficient för infallsvinkeln) – som mäter ljuset från alla vinklar ovanför mätplanet – är att föredra framför riktade sensorer. De förstnämnda sensorerna ger större mätutslag för en diffus ljuskälla av den typ som beskrivits här.

34. Temperaturen i testkärlen bör vara 23 ± 2 °C. I speciella fall, t.ex. vid test av instabila kemikalier eller metaller, måste förskjutningen av pH kontrolleras extra noggrant och pH bör hålla sig inom 6–9. Se (5) för ytterligare vägledning.

Löptid

35. Testet ska avslutas 14 dagar efter det att plantorna har placerats i provkärlen.

Mätningar och analytiska bestämningar

36. I början av testet är längden på testorganismens huvudskott 2,5 cm (se punkt 29). Längden mäts med en linjal (se tillägg 4) eller genom fotografering och bildanalys. De huvudskott hos testorganismen som framstår som normala respektive onormala bör bestämmas i början av testet och därefter minst en gång under den 14 dagar långa exponeringstiden samt när testet avslutas. Obs: Om man inte har bildanalys kan även en steril linjal användas för att mäta huvudskottets längd i början av och under testet. Arbetsbänken måste dock vara steriliserad innan växterna placeras i testkärlen. Registrera förändringar i plantutvecklingen. Det kan t.ex. gälla deformering av skotten, utseende, tecken på nekros, kloros, kollaps eller försämrad flytförmåga samt rötternas längd och utseende. Registrera också betydelsefulla inslag i testmediet, t.ex. förekomst av oupplöst material, algtillväxt, svamp och bakterier i provkärlet.

37. Utöver bestämningar av huvudskottets längd under testet bör de effekter testkemikalien har på tre eller flera av följande mätvariabler också bestämmas:

i. Sidogrenarnas totala längd

ii. Total skottlängd

iii. Total rotlängd

iv. Färskvikt

v. Torrvikt

vi. Antal kransar

▼M7

Anmärkning 1: De iakttagelser som gjorts under det preliminära testet kan vara till hjälp för att välja relevanta ytterligare mätningar bland de sex variabler som anges ovan.

Anmärkning 2: Bestämning av färsk- och torrvikt (parametrarna iv och v) rekommenderas starkt.

Anmärkning 3: På grund av att sackaros och ljus (rötternas exponering för ljus under testet) kan påverka bärare av auxin (tillväxthormon hos växter), och vissa kemikalier kan ha ett verkningssätt som liknar auxinets effekter, kan användningen av endpoints för rötter (parameter iii) ifrågasättas.

Anmärkning 4: Resultat från provningsjämförelsen visar höga variationskoefficienter (> 60 %) för sidogrenars totallängd (parameter i). Sidogrenarnas totala längd ingår i alla händelser i mätningen av skottets totala längd (parameter ii), som visar mer godtagbara variationskoefficienter (< 30 %).

Anmärkning 5: På grundval av ovanstående överväganden rekommenderas mätningar av följande huvudsakliga endpoints: skottets totala längd samt färsk- och torrvikt (parametrarna ii, iv och v). Parameter vi – antal kransar – lämnas åt testarens bedömning.

38. Fördelen med parametrarna huvudskottets längd och antal kransar är att de kan bestämmas för varje test- och kontrollkärl i början, under och i slutet av testet genom fotografi- och bildanalys, även om en steril linjal också kan användas.

39. Sidogrenarnas totala längd, total rotlängd (som en summa av alla sidogrenar eller rötter) samt total skottlängd (som en summa av huvudskottets och sidogrenarnas totala längd) kan mätas med en linjal i slutet av exponeringen.

40. Färsk- och/eller torrvikt måste bestämmas i början av testet med hjälp av ett prov från förkulturen som är representativt för vad som används för att starta testet, och vid slutet av testet med hjälp av växtmaterial från alla prov- och kontrollkärl.

41. Sidogrenarnas totala längd, total skottlängd, total rotlängd, färsk- och torrvikt samt antal kransar kan bestämmas enligt följande:

i. Sidogrenarnas totala längd: Sidogrenarnas totala längd kan bestämmas genom att alla sidogrenar mäts med en linjal i slutet av exponeringen. Sidogrenarnas totala längd är summan av alla sidogrenar i varje test- och kontrollkärl.

ii. Total skottlängd: Huvudskottets längd kan bestämmas genom bildanalys eller med hjälp av en linjal. Total skottlängd är summan av sidogrenarnas totala längd och huvudskottets längd i varje test- och kontrollkärl i slutet av exponeringen.

iii. Total rotlängd: Rotlängden kan bestämmas genom att alla rötter mäts med en linjal i slutet av exponeringen. Total rotlängd är summan av alla rötter i varje test- och kontrollkärl.

iv. Färskvikt: Färskvikten kan bestämmas genom att testorganismerna vägs i slutet av exponeringen. Allt växtmaterial i varje test- och kontrollkärl sköljs med destillerat vatten och klappas torrt med cellulosapapper. Efter

▼M7

denna förberedelse bestäms färskvikten genom vägning. Den initiala biomassan (färskvikt) bestäms med hjälp av ett prov bestående av testorganismer från samma kultur som används för att ympa provkärlen.

v. Torrvikt: Efter förberedelserna för bestämning av färskvikt torkas testorganismerna vid 60 °C till konstant vikt. Denna massa är torrvikten. Den initiala biomassan (torrvikt) bestäms med hjälp av ett prov bestående av testorganismer från samma kultur som används för att ympa provkärlen.

vi. Antal kransar: Alla kransar längs huvudskottet räknas.

Mätfrekvens och analytiska bestämningar

42. Vid statiskt testförfarande ska pH-värdet i alla testlösningar (testkoncentrationer) mätas i början och slutet av testet. Vid semistatiskt testförfarande mäts pH-värdet i varje färsk testlösning före varje byte till ny lösning och i motsvarande förbrukade lösning.

43. Ljusintensiteten ska mätas i odlingskammaren, inkubatorn eller klimatrummet i punkter på samma avstånd från ljuskällan som testorganismerna. Mätningar ska göras minst en gång under testets genomförande. Temperaturen hos mediet i ett ersättningskärl med enbart testmedium som hålls under samma betingelser i odlingskammaren, inkubatorn eller klimatrummet bör registreras minst en gång per dag (eller kontinuerligt med en datalogg).

44. Under testets gång ska testkemikaliens eller testkemikaliernas koncentrationer bestämmas med lämpliga intervaller. Vid ett statiskt testförfarande är minimikravet att koncentrationerna ska bestämmas i början och slutet av testet.

45. Om man vid ett semistatiskt testförfarande bedömer att koncentrationen av testkemikalien eller testkemikalierna inte kommer att ligga kvar inom ± 20 % av den nominella koncentrationen, måste man analysera alla nyberedda testlösningar liksom alla förbrukade lösningar vid byte till ny färsk lösning. För test i vilka den uppmätta startkoncentrationen av testkemikalien inte ligger inom ± 20 % av den nominella koncentrationen men tillräckliga bevis kan framläggas för att visa att startkoncentrationerna är repeterbara och stabila (dvs. inom intervallet 80–120 % av startkoncentrationen), räcker det om kemiska bestämningar utförs enbart för de högsta och lägsta testkoncentrationerna. I samtliga fall behöver bestämning av testkoncentrationer före byte till färsk testlösning bara utföras på ett enda replikatkärl för varje testkoncentration (eller på det samlade innehållet från samtliga replikat för respektive testkoncentration).

46. Om man kan visa att testkoncentrationen har hållits tillfredsställande inom ± 20 % av den nominella eller uppmätta startkoncentrationen genom hela testet kan analysen av resultaten baseras på nominella eller uppmätta startvärden. Om avvikelsen från den nominella eller uppmätta startkoncentrationen inte ligger inom ± 20 %, ska analysen av resultaten baseras på det geometriska medelvärdet av koncentrationen under exponeringen, eller på modeller som beskriver testkemikaliens avtagande koncentration (5).

Limit-test

47. Under vissa omständigheter, t.ex. när ett preliminärt test tyder på att testkemikalien inte har några toxiska effekter vid koncentrationer upp till 100 mg/l eller upp till dess löslighetsgräns i testmediet (eller om det är en beredning, upp till dispergeringsgränsen), kan man utföra ett limit-test. Man jämför då responsen mellan en kontrollgrupp och en testgrupp (med en koncentration på 100 mg/l eller lika med löslighetsgränsen). Det rekommenderas starkt att jämförelsen kompletteras med en bestämning av exponeringskoncentrationen. Alla testbetingelser samt kriterier för testresultatens giltighet

▼M7

som beskrivits tidigare gäller även för limit-test, med undantaget att antalet testreplikat ska vara dubbelt så stort. Tillväxten i kontrollgruppen och testgruppen kan analyseras med en statistisk metod för jämförelse av medelvärden, t.ex. t-test (Students t-test).

DATA OCH RAPPORTERING

Responsvariabler

48. Syftet med testet är att bestämma en testkemikalies effekter på tillväxten av *Myriophyllum spicatum*. Denna testmetod beskriver två responsvariabler.

a) Genomsnittlig specifik tillväxthastighet: Denna responsvariabel beräknas med hjälp av den tidsmässiga förändringen av det logaritmiska värdet av huvudskottets längd, och den tidsmässiga förändringen av det logaritmiska värdet av en andra variabel, dvs. total skottlängd, färskvikt, torrvikt eller antalet kransar över tiden (uttryckt i dagar) i kontrollerna och respektive testgrupp. Anmärkning: När det gäller mätparametern sidogrenarnas totala längd och total rotlängd är en beräkning av genomsnittlig tillväxthastighet inte möjlig. I början av testet har testorganismen inga sidogrenar och inga rötter (baserat på beredningen från förkulturen). Med utgångspunkt från värdet noll har beräkningen av den genomsnittliga tillväxthastigheten inte definierats.

b) Producerad mängd biomassa: Denna responsvariabel beräknas på grundval av ändringar av huvudskottets längd och ändringar av andra mätparametrar, företrädesvis total skottlängd, färskvikt, torrvikt eller antalet kransar samt andra parametrar om de anses användbara, i kontrollerna och respektive testgrupp.

49. Uppskattningar av toxiciteten bör grundas på huvudskottets längd och tre ytterligare mätvariabler (företrädesvis total skottlängd, färskvikt, torrvikt eller antalet kransar, se punkt 37 samt anmärkningarna 2, 4 och 5 till denna punkt), eftersom vissa kemikalier kan påverka andra mätvariabler mycket mer än huvudskottets längd. Denna effekt upptäcks inte om endast huvudskottets längd används som beräkningsmått.

Genomsnittlig specifik tillväxthastighet

50. Den genomsnittliga specifika tillväxthastigheten för en given tidsperiod beräknas som den logaritmiska ökningen av tillväxtvariablerna – huvudskottets längd och tre ytterligare mätvariabler (dvs. total skottlängd, färskvikt, torrvikt eller antalet kransar). Använd nedanstående formel för alla replikat av kontroll- och testlösningar:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln (N_j) - \ln (N_i)}{t}$$

där

μ_{i-j} är genomsnittlig specifik tillväxthastighet från tidpunkten i till tidpunkten j,

N_i är värdet på mätvariabeln i prov- respektive kontrollkärlet vid tidpunkten i,

N_j är värdet på mätvariabeln i prov- respektive kontrollkärlet vid tidpunkten j, och

t är tidslängden mellan tidpunkterna i och j.

▼M7

Beräkna ett medelvärde av tillväxthastigheten för varje testgrupp och kontrollgrupp tillsammans med variansskattningar.

51. Den genomsnittliga specifika tillväxthastigheten ska beräknas för hela tiden för testets genomförande (”i” i formeln betecknar början av tiden för testets genomförande, och ”j” slutet). Beräkna ett medelvärde av den genomsnittliga tillväxthastigheten för varje testkoncentration och kontrollgrupp tillsammans med variansskattningar. Bestäm dessutom tillväxthastigheten i olika skeden för att kunna bedöma testkemikaliens effekter under exponeringstiden (t.ex. genom analys av logaritmiska tillväxtkurvor).

52. Den procentuella tillväxthämningen (I_r) beräknas sedan för varje testkoncentration (testgrupp) med formeln

$$\%I_r = \frac{(\mu_C - \mu_T)}{\mu_C} \times 100$$

där

% I_r är den procentuella minskningen av den genomsnittliga specifika tillväxthastigheten,

μC är medelvärdet av μ i kontrollgruppen, och

μT är medelvärdet av μ i testgruppen.

Producerad mängd biomassa

53. Effekterna på producerad mängd biomassa bestäms med hjälp av mätvariabeln huvudskottets variabla längd och tre ytterligare mätvariabler (företrädesvis total skottlängd, färskvikt, torrvikt eller antalet kransar). Mätningarna görs i början och slutet av testet. För färskvikt eller torrvikt bestäms den initiala biomassan med hjälp av ett prov bestående av testorganismer från samma kultur som används för att ympa provkärlen. Beräkna ett medelvärde av den producerade mängden biomassa för varje testkoncentration och kontrollgrupp tillsammans med variansskattningar. Den genomsnittliga procentuella minskningen av den producerade mängden biomassa (% I_y) beräknas för varje testgrupp med formeln

$$\%I_y = \frac{(b_c - b_T)}{b_c}$$

där

% I_y är den procentuella minskningen av den producerade mängden biomassa,

bC är den slutliga biomassan minus den initiala biomassan för kontrollgruppen, och

bT är den slutliga biomassan minus den initiala biomassan för testgruppen.

Fördubblingstid

54. Fördubblingstiden (T_d) för huvudskottets längd är ett giltighetskriterium (se punkt 8). Den bestäms genom att infoga data som insamlats från kontrollkärlen i följande formel:

$T_d = \ln 2/\mu$

där μ är den genomsnittliga specifika tillväxthastigheten enligt beskrivningen i punkterna 50–52.

▼M7

Ritning av dos-respons-kurvor

55. Dos-respons-kurvor ska ritas som visar den genomsnittliga procentuella hämningen av responsvariabeln (I_r eller I_y) och logaritmen av testkemikaliens koncentration (I_r och I_y beräknas enligt avsnitt 53).

Bestämning av EC_x

56. Bestämningar av EC_x bör baseras både på genomsnittlig specifik tillväxthastighet (E_rC_x) och på producerad mängd biomassa (E_yC_x). De sistnämnda två responsvariablerna ska i sin tur bestämmas med hjälp av huvudskottets längd och eventuellt ytterligare mätvariabler (företrädesvis total skottlängd, färskvikt, torrvikt eller antalet kransar). Detta beror på att det finns kemikalier vars inverkan på huvudskottets längd skiljer sig från deras inverkan på andra mätvariabler. Toxicitetsparametrarna bör därför vara fyra EC_x-värden för varje beräknad tillväxthämningsnivå x: E_rC_x (huvudskottets längd), E_rC_x (företrädesvis total skottlängd, färskvikt, torrvikt eller antalet kransar), E_yC_x (huvudskottets längd) och E_yC_x (företrädesvis total skottlängd, färskvikt, torrvikt eller antalet kransar).

57. Observera att EC_x-värden som beräknats utifrån de två responsvariablerna inte är jämförbara, och att denna skillnad framgår när man tillämpar testresultaten. EC_x-värden som grundar sig på den genomsnittliga specifika tillväxthastigheten (E_rC_x) är oftast högre än de som grundar sig på den producerade mängden biomassa (E_yC_x) om de föreskrivna testbetingelserna i denna testmetod är uppfyllda, beroende på den matematiska grunden i respektive fall. Denna skillnad ska inte tolkas som en skillnad i känslighet mellan de två responsvariablerna, utan beror på att värdena är matematiskt olika.

Statistisk behandling

58. Målet är att bestämma det kvantitativa förhållandet mellan koncentration och respons med hjälp av regressionsanalys. Man kan använda viktad linjär regression efter att ha gjort en linjär transformation av responsdata, t.ex. med probit-, logit- eller Weibullvärden (7). Icke-linjära regressionsmetoder är dock att föredra, eftersom de är bättre anpassade för att hantera oundvikliga oregelbundenheter i data och avvikelser från jämna fördelningskurvor. I närheten av nollpunkten (ingen tillväxthämning) och fullständig tillväxthämning kan sådana oregelbundenheter bli felaktigt uppförstorade genom linjäriseringen och därigenom störa analysen (7). Observera att standardmetoder för analys med probit-, logit- eller Weibulltransformationer är avsedda för dikotoma data (dvs. tvåpunktsfördelade data, såsom dödlighet–överlevnad) och därför måste modifieras för att kunna användas för data rörande tillväxthastighet eller producerad mängd biomassa. Speciella metoder för bestämning av EC_x-värden ur kontinuerliga data återfinns i (8), (9) och (10).

59. För varje analyserad responsvariabel används förhållandet mellan koncentration och respons för att göra punktskattningar av EC_x-värden. Om möjligt ska 95-procentiga konfidensgränser bestämmas för varje skattning. Anpassningsgraden (”goodness of fit”) mellan responsdata och regressionsmodellen ska bestämmas antingen grafiskt eller statistiskt. Regressionsanalysen ska göras på responsvärden från enskilda replikat, inte på medelvärden från testgrupper.

60. När tillgängliga regressionsmodeller eller regressionsmetoder inte lämpar sig för de aktuella dataserierna kan skattningar av EC_{50}-värden och konfidensgränser också bestämmas genom linjär interpolation och bootstrapping (10).

61. För skattning av LOEC (och därmed även av NOEC) jämförs medelvärden från testlösningarna med hjälp av variansanalysmetoder (ANOVA). Medelvärdet för varje koncentration jämförs sedan med medelvärdet för kontrollerna med hjälp av en lämplig metod för multipeljämförelse eller trendtest, t.ex. Dunnetts eller Williams test (12) (13) (14) (15) (16). Man måste avgöra om antagandet för ANOVA om variansens homogenitet är uppfyllt. Detta kan göras grafiskt eller med ett etablerat test (15). t.ex. Levenes eller Bartletts test. Skulle antagandet om variansens homogenitet inte vara uppfyllt kan

▼M7

man ibland korrigera för detta genom logaritmisk transformation av data. Om heterogeniteten i variansen är extremt stor och inte kan korrigeras genom transformation, ska man överväga att göra analysen med t.ex. Jonkheeres trendtester av ”step-down”-typ. Mer information om bestämning av NOEC finns i (10).

62. Nya forskningsrön har lett till att man avråder från användning av NOEC-värden. I stället rekommenderas att man använder punktskattningar av EC_x baserade på regressionsanalys. För detta *Myriophyllum*-test har ännu inget passande värde på x fastställts. Ett intervall på 10–20 % förefaller dock vara lämpligt, beroende på vilken responsvariabel som används. Både EC_{10} och EC_{20} och deras konfidensgränser bör redovisas.

Rapportering

63. Testrapporten ska innehålla följande information:

Testkemikalie

Monokomponentämne:

— fysiskt utseende, vattenlöslighet och ytterligare relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper,

— kemiska beteckningar, såsom IUPAC- eller CAS-beteckning, CAS-nummer, SMILES- eller InChI-kod, strukturformel, renhet, kemisk beteckning på föroreningar i förekommande fall och om möjligt, osv. (inklusive organisk kolhalt i förekommande fall),

Multikomponentämne, UVCB-ämne eller blandning:

— karakteriseras så långt som möjligt genom kemisk beteckning (se ovan), kvantitativ förekomst och relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper hos beståndsdelarna.

Testarter.

— Vetenskaplig beteckning och källa.

Testbetingelser

— Använt testförfarande (statiskt eller semistatiskt).

— Startdatum och tid för testets genomförande.

— Testmedium.

— Beskrivning av testupplägget: provkärl och lock, lösningsvolymer och huvudskottets längd per provkärl vid testets början.

— Testkoncentrationer (nominella respektive uppmätta värden) och antal replikat per koncentration.

— Metoder för beredning av stam- och testlösningar, med uppgift om användning av lösnings- eller dispergeringsmedel.

— Temperatur under testets gång.

— Ljuskälla, ljusintensitet och ljushomogenitet.

— pH-värden i test- och kontrollmedier.

— Analysmetod för testkemikalien med relevanta uppgifter för kvalitetsbedömning (kontroll av testresultatens giltighet, standardavvikelser eller konfidensgränser för analyserna).

▼M7

— Metoder för bestämning av huvudskottets längd och andra mätvariabler, t.ex. total längd för sidogrenar, total skottlängd, total rotlängd, färskvikt, torrvikt eller antal kransar.

— Kulturens tillstånd (steril eller icke-steril) i varje test- och kontrollkärl vid varje observation.

— Alla avvikelser från denna testmetod.

Resultat

— Rådata: huvudskottets längd och andra mätvariabler i alla test- och kontrollprov vid respektive observation och analystillfälle.

— Medelvärden och standardavvikelser för respektive mätvariabel.

— Tillväxtkurvor för varje mätvariabel.

— Beräknade responsvariabler för respektive testreplikat, inklusive medelvärden och variationskoefficient för replikaten.

— Diagram över förhållandet mellan koncentration och tillväxthämmande effekt.

— Uppskattningar av toxiska endpoints för responsvariablerna, t.ex. EC_{50}, EC_{10} och EC_{20} samt dithörande konfidensintervall. Om man räknat fram LOEC- och/eller NOEC-värden ska dessa anges, liksom de statistiska metoder som använts vid beräkningen.

— Om ANOVA-metoder har använts: storleken på observerad effekt (t.ex. minsta signifikanta skillnad).

— Eventuell tillväxtstimulans som har konstaterats i testlösningarna.

— Synliga tecken på fytotoxicitet samt observationer avseende testlösningarna.

— Diskussion av resultaten, inbegripet eventuell inverkan på testresultatet som kan tillskrivas avvikelser från denna testmetod.

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. m.fl. (2010), *Myriophyllum spicatum* als ökotoxikologischer Testorganismus: Methodenentwicklung eines sedimentfreien Testsystems und erste Ergebnisse mit 3,5-Dichlorphenol, *Umweltwiss Schadst Forsch,* nr 22, s. 702–710.

(3) Kapitel C.26 i denna bilaga*: Bestämning av tillväxthämning hos Lemna-arter (andmat).*

(4) OECD (2014), ”*Myriophyllum spicatum* Toxicity Test: Results of an interlaboratory ring test using a sediment-free test system”, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series Testing and Assessment, nr 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, nr 23, OECD Publishing, Paris.

(6) Kapitel C.51 i denna bilaga: Toxicitetstest med vatten–sediment på *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. m.fl. (1992), Statistical treatment of data from microbial toxicity tests, *Environmental Toxicology and Chem*istry, vol. 11/2, s. 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, s. 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, nr 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, s. 1096-1121.

(13) Dunnett, C. W. (1964), New tables for multiple comparisons with a control, *Biometrics*, vol. 20/3, s. 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, s. 103–117.

(15) Williams, D. A. (1972), The comparison of several dose levels with a zero dose control, *Biometrics*, vol. 28/2, s. 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, s. 93–96.

▼M7

Tillägg 1

DEFINITIONER

Biomassa: färskvikt och/eller torrvikt av levande materia i en population. I detta test är biomassan summan av huvudskottet, alla sidogrenar och alla rötter.

Kemikalie: ett ämne eller en blandning.

Kloros: förändring hos testorganismens färg, från grön till gulfärgad, särskilt på kransarna.

EC_x: den koncentration av testkemikalien upplöst i vatten som inom en fastställd exponeringsperiod leder till en minskning på x % (t.ex. 50 %) av tillväxten hos *Myriophyllum spicatum* (omnämns uttryckligen vid avvikelse från fullständig eller normal testperiod). För att entydigt ange om EC-värdet bygger på tillväxthastighet eller producerad mängd biomassa används beteckningen E_rC för tillväxthastighet och E_yC för producerad mängd biomassa, åtföljt av mätvariabeln, t.ex. E_rC (huvudskottets längd).

Tillväxt: en ökning av mätvariabeln under testperioden, t.ex. huvudskottets längd, total längd för sidogrenar, total skottlängd, total rotlängd, färskvikt, torrvikt eller antal kransar.

Tillväxttakt (genomsnittlig specifik tillväxthastighet): logaritmisk ökning av mätvariabeln under exponeringstiden. *Anmärkning:* Responsvariabler som är relaterade till tillväxttakten är inte beroende av testets varaktighet så länge tillväxtmönstret för oexponerade kontrollmekanismer är exponentiellt.

Lägsta koncentration med observerad effekt (**LOEC – "Lowest Observed Effect Concentration"**): den lägsta testade koncentration vid vilken man kan fastställa att testkemikalien har en statistiskt signifikant hämmande effekt på tillväxten (vid $p < 0,05$) inom en given exponeringstid, jämfört med kontrollen. Alla testkoncentrationer ovanför LOEC bör ha skadliga verkningar som är lika stora som eller större än de verkningar som observeras vid LOEC. Om dessa två villkor inte är uppfyllda bör en fullständig förklaring ges till hur man har valt LOEC (och därmed NOEC).

Mätvariabler: alla slags variabler som mäts för att uttrycka testets endpoint med hjälp av en eller flera responsvariabler. I denna testmetod är mätvariablerna huvudutskottets längd, total längd för sidogrenar, total skottlängd, total rotlängd, färskvikt, torrvikt eller antal kransar.

Monokultur: kultur bestående av en enda art.

Nekros är död vävnad (dvs. vit eller mörkbrun) hos testorganismen.

Nolleffektkoncentration (**NOEC** – "No Observed Effect Concentration"): testkoncentrationen omedelbart under LOEC.

Responsvariabel: variabel för bestämning av toxicitet. Variabeln fås fram genom att olika beräkningsmetoder tillämpas på uppmätta parametrar för biomassa. I den aktuella metoden är tillväxthastighet och producerad mängd biomassa responsvariabler som beräknas med hjälp av mätvariabler såsom huvudskottets längd, total skottlängd, färskvikt, torrvikt eller antal kransar.

Semistatiskt testförfarande (med regelbunden förnyelse av testlösning): test där testlösningen byts med bestämda intervall under testet.

▼M7

Statiskt testförfarande: testmetod utan regelbunden förnyelse av testlösningen under testet.

Testkemikalie: varje ämne eller blandning som testas med denna testmetod.

Endpoint: den allmänna faktor som genom inverkan av en testkemikalie förändras jämfört med ett kontrollprov utan testkemikalie. I det aktuella testet är endpointen tillväxthämning, som kan uttryckas med olika responsvariabler baserade på en eller flera mätvariabler.

Testmedium: syntetiskt odlingsmedium i vilket testplantorna växer när de exponeras för testkemikalien. Testkemikalien är vanligen löst i testmediet.

UVCB-ämne: ämne med okänd eller varierande sammansättning, komplexa reaktionsprodukter eller biologiskt material.

Producerad mängd biomassa: värdet på en mätvariabel i slutet av exponeringstiden minus motsvarande värde i början av exponeringstiden. Anmärkning: Om tillväxtmönstret för oexponerade organismer är exponentiellt minskar responsvariabler som är baserade på producerad mängd biomassa under testets varaktighet.

▼M7

Tillägg 2

MODIFIERAT ANDREWSMEDIUM FÖR STAMKULTUR OCH FÖRKULTUR.

Det modifierade Andrewsmedium som behövs för stamkulturen och förkulturen fås fram med fem separat beredda näringsstamlösningar med tillsats av 3 % sackaros.

Tabell 1

Sammansättning hos Andrews näringslösning: (ASTM-beteckning E 1913-1904)

Produktion av näringsstamlösningar			Produktion av näringslösning
Stamlösning	Kemikalie	Initial vikt per 1 000 ml	ml per 5 liter näringslösning
1	KCl	74,6 mg	50
	KNO_3	8,08 g	
	$Ca(NO_3)_2 \times 4\ H_2O$	18,88 g	
2	$MgSO_4 \times 7\ H_2O$	9,86 g	50
3	Se stamlösning 3.1 nedan		50
4	KH_2PO_4	2,72 g	50
5	$FeSO_4 \times 7\ H_2O$	0,278 g	50
	$Na_2EDTA \times 2\ H_2O$	0,372 g	

Stamlösningar kan förvaras i kylskåp i sex månader (vid 5–10 °C). Endast stamlösning nr 5 har en reducerad hållbarhetstid (två månader).

Tabell 2

Produktion av stamlösning 3.1 för beredning av stamlösning 3

Kemikalie	Initial vikt 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

När stamlösning 3.1 har producerats (tabell 2) djupfryses lösningen i portioner på cirka 11 ml (temperaturen får inte överstiga – 18 °C). De djupfrysta portionerna har en hållbarhetstid på fem år.

För att producera stamlösning 3, tina upp stamlösning 3.1, häll 10 ml av den i en enliters mätkolv och tillsätt ultrarent vatten upp till kolvens markering.

För att få fram det modifierade Andrewsmediet, häll cirka 2 500 ml ultrarent vatten i en femliters mätkolv. När 50 ml av varje stamlösning har tillsatts, fyll 90 % av mätkolven med ultrarent vatten och ställ in pH på 5,8.

▼M7

Tillsätt därefter 150 g upplöst sackaros (3 % per 5 l) och fyll mätkolven med ultrarent vatten upp till markeringen. Häll till sist näringsläsningen i enliters Schottkolvar och autoklavera vid 121 °C i 20 minuter.

Den näringslösning som fås fram på detta sätt kan hållas steril i kylskåp vid (5–10 °C) i tre månader.

Modifierat Andrewsmedium för toxicitetstest utan sediment

Det tiofaldigt koncentrerade modifierade Andrewsmedium som krävs för att få fram testlösningarna bereds av de fem näringsstamlösningar som anges i tabellerna 1 och 2, med tillsats av 30 % sackaros. Häll cirka 100 ml ultrarent vatten i en enliters mätkolv. Tillsätt 100 ml av var och en av stamlösningarna, ställ in pH på 5,8. Tillsätt därefter 30 % upplöst sackaros (300 g per 1 000 l) och fyll mätkolven med ultrarent vatten upp till markeringen.

Häll till sist näringsläsningen i halvliters Schottkolvar och autoklavera vid 121 °C i 20 minuter.

Den tiofaldigt koncentrerade modifierade näringslösning som fås fram på detta sätt kan hållas steril i kylskåp vid (5–10 °C) i tre månader.

▼M7

Tillägg 3

BEHANDLING AV STAMKULTURER

I tillägg 3 beskrivs stamkulturen av *Myriophyllum spicatum* L ([1]), en submers tvåhjärtbladig växt som hör till slingesläktet. Mellan juni och augusti sticker nästan omärkliga rosa-vita blommor upp ovanför vattenytan. Växterna är rotade i botten genom ett system av robusta jordstammar och förekommer på hela norra halvklotet i näringsrika, ej förorenade och kalkrika stillastående vatten med lerigt substrat. Axslinga föredrar sötvatten, men förekommer även i bräckt vatten.

För stamkulturer utan sediment under laboratorieförhållanden krävs sterila plantor. Sterila plantor kan erhållas från det toxikologiska laboratoriet vid tyska Umweltbundesamt (Tysklands federala miljöbyrå).

Alternativt kan testorganismer beredas av icke-sterila växter i enlighet med ASTM-beteckning E 1913-04. Se nedan – utdrag från ASTM Standard Guide – förfarande för odling av *Myriophyllum sibiricum* som hämtats från naturen:

> ”Om icke-sterila plantor som hämtas från naturen används som utgångspunkt, samla in rotskott från *M. sibiricum* under hösten. Placera rotskotten i ett 20-litersakvarium med 5 cm sterilt sediment som är täckt med kvartssand eller t.ex. av Turface® och 18 liter reagensvatten. Lufta akvariet och upprätthåll en temperatur på 15 °C och en fluensgrad på 200–300 μmol m^{-2} s^{-1} under 16 timmar per dag. Växtkulturen i akvariet kan bevaras som en reservväxtkälla om de sterila växtkulturerna förstörs genom mekaniska fel i odlingskammaren, förorening eller av andra orsaker. De växter som odlas i akvariet är inte sterila och sterila kulturer kan inte bevaras i kulturens odlingssystem. För att sterilisera kulturen avlägsnas växterna från akvariet och sköljs under rinnande avjonat vatten i cirka en halvtimme. Växterna desinficeras under aseptiska förhållanden i ett dragskåp med laminärt luftflöde under mindre än 20 minuter (tills den största delen av växtvävnaden har blekts och endast den växande spetsen fortfarande är grön) i en lösning av 3 % (w/v) natriumhypoklorit som innehåller 0,01 % av ett lämpligt ytaktivt medel. Skaka desinfektionsmedlet och växtmaterialet. Segment med flera knutar överförs till sterila odlingsrör innehållande 45 ml steriliserat modifierat Andrewsmedium och tillsluts med vanliga lock för kulturer. Endast ett växtsegment placeras i varje testkärl. Laboratorieförseglingsfilm används för att se till att odlingskärlet är tillslutet. När en steril kultur har etablerats bör växtsegment som innehåller flera knutar överföras till nya testkärl som innehåller färska flytande näringsmedier varje tionde till tolfte dag. Genom odling på agarplattor ska det visas att växterna är sterila och förblir så i åtta veckor innan testningen inleds.”

Eftersom det modifierade Andrewsmediet innehåller sackaros (som stimulerar tillväxten av svampar och bakterier) måste allt material och alla lösningar framställas och odlingen ske under sterila förhållanden. Alla vätskor samt utrustning steriliseras före användning. Sterilisering sker genom varmluftsbehandling (210 °C) i fyra timmar eller autoklavering i 20 minuter vid 121 °C. Dessutom ska alla kolvar, tallrikar, skålar osv. och annan utrustning genomgå flambehandling på en steril arbetsbänk strax före användning.

Stamkulturer kan förvaras vid reducerad belysning och låg temperatur (50 μE m^{-2} s^{-1}, 20 ± 2 °C) under lång tid utan att de behöver startas på nytt. Odlingsmediet

([1]) Carl von Linné (* 23 maj 1707 i Råshult/Älmhult, † 10 januari 1778 i Uppsala).

▼M7

för *Myriophyllum* bör vara samma som det som används i testen, men för stamkulturer kan andra näringsrika medier användas.

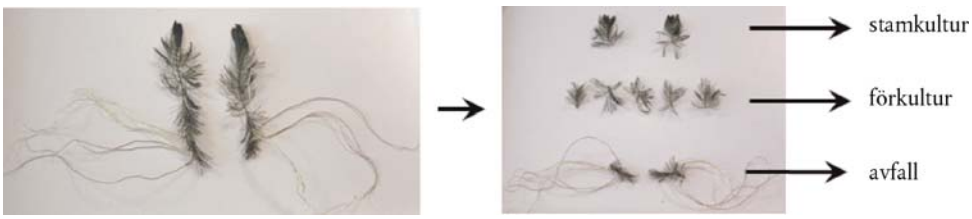
Växtsegmenten fördelas axeniskt mellan flera 500 ml Erlenmeyerkolvar och/eller 2 000 ml Fernbachkolvar. Varje kolv fylls med cirka 450 respektive 1 000 ml modifierat Andrewsmedium. Därefter försluts kolvarna axeniskt med cellulosa-proppar.

Dessutom är en grundlig flambehandling av utrustningen vid en steril arbetsbank precis före användning absolut nödvändig. Beroende på antal och storlek överförs växterna till en färsk näringslösning ungefär var tredje vecka.

Spetsar och segment av stammens mittdel kan användas för denna förnyade kultur. Antal och storlek på överförda växter (eller växtsegment) beror på hur många växter som behövs. Man kan t.ex. överföra fem skottsegment till en Fernbachkolv och tre skottsegment till en Erlenmeyerkolv, var och en med en längd på 5 cm. Rotade, blommande, döda eller på annat sätt iögonenfallande delar kasseras.

Figur 1

Klippning av plantor för stam- och förkulturen efter tre veckors odling.



Växterna odlas i 500 ml Erlenmeyerkolvar och 2 000 ml Fernbachkolvar kolvar i en kylinkubator vid 20 ± 2 °C med kontinuerligt ljus vid ungefär 100–150 µE m^{-2} s^{-1} eller 6 000–9 000 lux (testkärlets belysning med ”varmt vitt ljus”).

Figur 2

Växtodling i en kylinkubator med belysning av testkärlen.



Använd kemiskt rena (syratvättade) och sterila odlingskärl av glas. Hanteringen ska ske med aseptiska metoder. Om stamkulturen förorenas av t.ex. alger, svamp och/eller bakterier bör man bereda en ny kultur eller använda en stamkultur från ett annat laboratorium för att ersätta den förorenade kulturen.

▼M7

Tillägg 4

UNDERHÅLL AV FÖRKULTUR OCH BEREDNING AV TESTORGANISMEN FÖR TESTET

För att få fram en förkultur klipper man skott från stamkulturen i segment med två kransar var. Segmenten placeras i Fernbachkolvar fyllda med modifierat Andrewsmedium (med 3 % sackaros). Varje kolv kan innehålla upp till 50 skottsegment. Det är dock viktigt att se till att segmenten är livskraftiga och inte har rötter, sidogrenar eller knoppar (se figur 1 i tillägg 3).

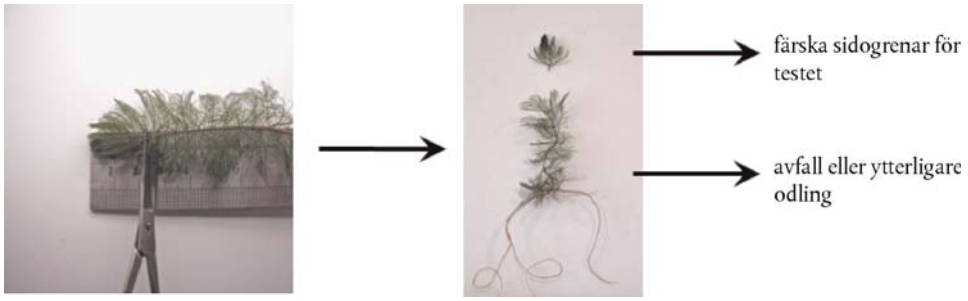
Förkulturens organismer odlas under 14 till 21 dagar under sterila förhållanden i klimatodlingskammare med omväxlande 16-/8-timmars ljus-/mörkerfaser. Ljusintensiteten väljs från intervallet 100–150 μE m^{-2} s^{-1}. Temperaturen i testkärlen bör vara 23 ± 2 °C.

Eftersom det modifierade Andrewsmediet innehåller sackaros (som stimulerar tillväxten av alger, svampar och bakterier) bör testkemikalielösningarna beredas och odlingen ske under sterila förhållanden. Alla vätskor samt utrustning steriliseras före användning. Sterilisering sker via varmluftsbehandling (210 °C) under fyra timmar eller autoklavering under 20 minuter vid 121 °C. Dessutom ska alla kolvar, tallrikar, skålar osv. och annan utrustning genomgå flambehandling på en steril arbetsbänk strax före användning.

Skotten avlägsnas axeniskt från förkulturkolvarna. Välj så homogent material som möjligt. Varje test kräver minst 60 testorganismer (testning sker med åtta koncentrationer av testkemikalien). För testningen tas färska sidogrenar från förkulturerna. Korta av dem till 2,5 cm från basen (mätt med linjal) och överför dem till en bägare med sterilt modifierat Andrewsmedium. De färska sidogrenarna kan användas för toxicitetstest på *Myriophyllum spicatum* utan sediment.

Figur 2:

Klippning av plantor från förkulturen för toxicitetstest på *Myriophyllum spicatum* utan sediment.



▼M7

C.51 TOXICITETSTEST MED VATTEN–SEDIMENT PÅ *MYRIOPHYLLUM SPICATUM*

INLEDNING

1. Den här testmetoden motsvarar OECD:s testriktlinje (TG) 239 (2014). Testmetoder finns för monokotyledona vattenlevande flytväxter, *Lemna*-arter (1) och algarter (2). Dessa metoder används rutinmässigt för att generera data för att hantera risker med testkemikalier, särskilt kemikalier med ogräsbekämpande verkan, för vattenlevande växtarter som inte ska bekämpas. Men i vissa fall kan data för ytterligare makrofytarter krävas. Enligt den senaste vägledningen från SETAC:s (*Society of Environmental Toxicology and Chemistry*) workshop om AMRAP (*Aquatic Macrophyte Risk Assessment for Pesticides*) kan data för rotade makrofytarter krävas för testkemikalier där man vet att *Lemna*-arter och alger inte är känsliga för verkningssättet eller om uppdelning i sediment är ett problem som leder till exponering via rötternas upptag (3). Baserat på nuvarande kunskap och erfarenhet valdes *Myriophyllum* spp. som föredragna arter i de fall där det krävs data för submersa rotade tvåhjärtbladiga arter (4) (5) (6). Detta test ersätter inte andra akvatiska toxicitetstester, utan bör snarare komplettera dessa tester för att möjliggöra en mer fullständig risk- och farobedömning av vattenväxter. Testmetoden Toxicitetstest med vatten–sediment på *Myriophyllum spicatum* kompletterar toxicitetstestet på *Myriophyllum spicatum* utan sediment (7).

2. Här beskrivs en testmetod som gör det möjligt att bedöma testkemikaliernas verkan på den rotade vattenväxten *Myriophyllum spicatum*, som växer i vatten–sedimentsystem. Testmetoden bygger dels på befintliga metoder (1) (2) (8) och tar hänsyn till den senaste forskningen om riskbedömning av vattenväxter (3). Metoden med vatten–sediment har validerats i en internationellt provningsjämförelse som genomfördes med *Myriophyllum*-arter. De odlades under statiska förhållanden och exponerades för testkemikalien genom tillsats direkt i vattnet (9). Testsystemet kan dock enkelt anpassas för att möjliggöra exponering via spikade sediment eller via vattenfasen i semistatiska metoder eller metoder med pulsdosering, även om dessa scenarier inte formellt har testats i en provningsjämförelse. Den allmänna metoden kan dessutom användas för andra rotade submersa och emersa arter, inklusive andra *Myriophyllum*-arter (t.ex. *Myriophyllum aquaticum*) och *Glyceria maxima* (10). Testbetingelser, utformning och varaktighet kan behöva ändras om alternativa arter används. Framför allt krävs mer arbete för att fastställa lämpliga förfaranden för *Myriophyllum aquaticum* (storslinga). Dessa alternativ presenteras inte i detalj i denna testmetod, som beskriver standardförfarandet för exponering av *Myriophyllum* i ett statiskt system via vattenfasen.

3. Denna testmetod gäller ämnen för vilka testmetoden har validerats (närmare uppgifter finns i rapporten från provningsjämförelsen (9)), beredningar eller kända blandningar. *Myriophyllum*-testet kan utföras för att uppfylla ett Tier-1 datakrav som uppstår till följd av att testkemikalien potentiellt övergår till sedimentet eller osäkerhet avseende verkningssätt/selektivitet. Ett laboratoriebaserat *Myriophyllum*-test kan likaså krävas som ett led i strategier med flera testnivåer för att hantera eventuella risker för vattenväxter. Orsaken till testet avgör exponeringsvägen (dvs. via vatten eller sediment). Innan denna testmetod används för lagstadgad testning av en blandning används bör man överväga om, och i så fall varför, den kommer att ge godtagbara resultat för det syftet. Sådana överväganden är inte nödvändiga om blandningen måste provas enligt lag.

▼M7

TESTPRINCIP

4. Testet är utformat för att bedöma kemikalierelaterade effekter på tillväxten hos *Myriophyllum*-växter som växer i standardiserade medier (vatten, sediment och näringsämnen). För detta ändamål planteras skottspetsar från friska ej blommande plantor i standardiserat konstgjort sediment, som kompletteras med ytterligare näringsämnen för att säkerställa en lämplig tillväxt. Därefter förvaras växterna i Smart- och Barko-medier (tillägg 1). Efter en etableringsperiod för att möjliggöra rotbildning exponeras växterna för en serie testkoncentrationer som tillsätts i vattenpelaren. Alternativt kan exponering via sedimentet simuleras genom att spika det artificiella sedimentet med testkemikalien och plantera om växterna i det spikade sedimentet. I båda fallen förvaras växterna därefter under kontrollerade miljöförhållanden i 14 dagar. Effekterna på tillväxten bestäms från kvantitativa bedömningar av skottets längd, färskvikt och torrvikt, samt kvalitativa observationer av symptom som kloros, nekros eller missbildningar hos växten.

5. För att kvantifiera testkemikaliens effekter jämförs tillväxten i testlösningarna med kontrollväxternas tillväxt. Därefter bestäms den koncentration som orsakar en bestämd procent (x) av tillväxthämning. Denna koncentration betecknas som EC_x, där värdet ”x” beror på vilka lagstadgade krav som gäller, t.ex. EC_{10}, EC_{20} och EC_{50}. Det bör noteras att uppskattningarna av värdena EC_{10} och EC_{20} endast är tillförlitliga och lämpliga för tester där kontrollväxternas variationskoefficienter faller under den uppskattade effektnivån, dvs. variationskoefficienterna bör vara < 20 % för en stabil uppskattning av ett EG_{20}-värde.

6. Både genomsnittlig specifik tillväxtgrad (uppskattas genom bedömningar av skottets längd samt färsk- och torrvikt) och producerad mängd biomassa (uppskattas genom en beräkning av ökningen av skottets längd och av färsk- och torrvikten) hos obehandlade och behandlade plantor bör bestämmas. Specifik/a tillväxtgrad/er (r) och utbyte (y) används sedan för att bestämma E_rC_x (t.ex. E_rC_{10}, E_rC_{20}, E_rC_{50}) respektive E_yC_x (t.ex. E_yC_{10}, E_yC_{20}, E_yC_{50}).

7. Vid behov kan den lägsta koncentrationen med observerad effekt (LOEC) och den högsta koncentrationen utan observerad effekt (NOEC) också bestämmas statistiskt genom beskattningar av genomsnittlig specifik tillväxttakt och producerad mängd biomassa.

INFORMATION OM TESTKEMIKALIEN

8. Man bör ha tillgång till en analysmetod som är tillräckligt känslig för kvantitetsbestämning av testkemikalierna i testmediet.

9. Information om testkemikalien som kan vara användbar för att fastställa testbetingelserna inkluderar strukturformel, sammansättning när det gäller multikomponentämnen, UVCB-ämnen, blandningar eller beredningar, renhet, vattenlöslighet, stabilitet i vatten och ljus, syradissociationskonstant (pK_a), fördelningskoefficient oktanol/vatten (K_{ow}), K_d till sediment om det finns tillgängligt, ångtryck och biologisk nedbrytbarhet. Löslighet i vatten och ångtryck kan användas för att beräkna Henrys konstant, som visar om det är sannolikt att förlusterna av testkemikalien under tiden för testets genomförande kommer att vara betydande. Om förluster av testkemikalierna är sannolika bör de kvantifieras och de efterföljande stegen för att kontrollera sådana förluster bör dokumenteras. Om uppgifterna om testkemikaliens löslighet och stabilitet är osäkra bör man bedöma dessa egenskaper under testbetingelserna, dvs. i det odlingsmedium, vid den temperatur och under de belysningsförhållanden som används i testet. Obs: om ljusberoende peroxiderande växtbekämpningsmedel testas bör den laboratoriebelysning som används ha motsvarande ultraviolett ljus som förekommer i naturligt solljus.

▼M7

10. pH-värdet bör mätas och justeras i förekommande fall. pH-kontrollen av testmediet är särskilt viktig, t.ex. när man testar metaller eller kemikalier som är hydrolytiskt instabila. Närmare vägledning för testning av kemikalier vars fysikalisk-kemiska egenskaper gör dem svåra att testa finns i OECD:s vägledningsdokument (11).

TESTETS GILTIGHET

11. För att testresultaten ska vara giltiga måste kontrollväxternas genomsnittliga totala skottlängd och färskvikt åtminstone fördubblas under testets exponeringsfas. Dessutom får kontrollplantorna inte visa synliga symptom på kloros och bör vara fria från synliga föroreningar av andra organismer som alger och/eller bakteriebeläggningar på växterna, sedimentets yta och i testmediet.

12. Den genomsnittliga variationskoefficienten för producerad mängd biomassa (baserat på mätningar av skottens färskvikt (dvs. från början till slutet av testet) i kontrollkulturerna får inte överskrida 35 % mellan replikaten.

REFERENSKEMIKALIE

13. Referenskemikalier, t.ex. 3,5-diklorfenol som används i provningsjämförelsen (9), bör regelbundet testas för att kontrollera resultatet av provningen över tiden. Enligt data från provningsjämförelsen ligger de genomsnittliga EC50-värdena för 3,5-DCP för olika responsvariabler mellan 4,7 och 6,1 mg/l (se rapporten från provningsjämförelsen för information om förväntat konfidensintervall runt dessa värden). Det är lämpligt att testa en referenskemikalie minst två gånger per år eller, om testen utförs sällan, parallellt med de definitiva toxicitetstesterna. Vägledning om förväntade EC50-värden för 3,5-DCP finns i dokumentet *Statistical Report of the International Ring-test* (9).

BESKRIVNING AV TESTMETODEN

Provningsutrustning

14. Testet bör utföras under kontrollerade miljöförhållanden, det vill säga i odlingskammare, odlingsrum eller i laboratorium, med kontrollerbar dygnslängd, belysning och temperatur (se avsnittet ”Testbetingelser”, punkterna 56–58). Stamkulturer bör förvaras separat från testkärlen.

15. Undersökningen bör genomföras med användning av glastestkärl som akvarier eller bägare. Vanligtvis används tvåliters glasbägare (de bör vara cirka 24 cm höga och 11 cm i diameter). Andra (dvs. större) kärl kan dock vara lämpliga, under förutsättning att vattendjupet är tillräckligt stort för att möjliggöra obegränsad tillväxt och växterna kan hållas nedsänkta under testperioden.

16. Plast- eller glaskrukor (cirka 9 cm i diameter, 8 cm höga och 500 ml volym) kan användas som behållare för att plantera växterna i sedimentet. Alternativt kan glasbägare användas och är att föredra i vissa fall (t.ex. vid testning av hydrofoba kemikalier eller kemikalier med hög K_{ow}).

17. Krukans/behållarens storlek måste övervägas i samband med valet av testkärl och testets utformning (se nedan). Om testutformning A (ett skott per kruka, tre krukor per kärl) tillämpas kan man behöva använda mindre krukor eller större kärl. Om testutformning B (tre skott per kruka, en kruka per kärl) används bör de angivna kruk- och kärlstorlekarna vara tillräckliga. I samtliga fall bör vattendjupet vara 12 cm över sedimentets topp. Förhållandet mellan sedimentets ytarea/volym och ytvattenarea/volym bör registreras.

▼M7

Testorganism

18. De allmänna tillvägagångssätt som beskrivs i denna testmetod kan användas för att testa en rad olika vattenlevande växtarter De förhållanden som anges i denna testmetod har dock skräddarsytts för att testa *Myriophyllum spicatum*, en vattenlevande art som hör till slingesläktet. Denna tvåhjärtbladiga art tillhör familjen Haloragaceae (slingeväxter).

19. *Myriophyllum spicatum* (axslinga) är en submers rotad vattenväxt som tål många olika förhållanden och växer i både statiska och strömmande vattenmassor. *M. spicatum* är perenn och endast rötterna är kvar under vintern. Vanligen blommar de och sätter frö fritt, men vegetativ fortplantning från axillära knoppar eller stamfragment som lossas naturligt eller vid störning är ofta den primära odlingsmetoden.

Odling av testorganismen

20. Växter kan erhållas från naturliga populationer eller via leverantörer av vattenlevande växter. I båda fallen bör växtkällan dokumenteras och arternas identitet bör kontrolleras. Om axslinga samlas in från naturen är det viktigt att mycket noggrant fastställa att rätt art samlas in, särskilt i regioner där den kan hybridisera med andra arter från slingesläktet. Vid osäkerhet rekommenderas användning av kontrollerade laboratoriekulturer från kända källor. Växter som har exponerats för kemiska föroreningar eller som samlats in från förorenade platser bör inte användas i detta test.

21. I regioner där *M. spicatum* är svår att få tag på under vintermånaderna kan långsiktig förvaring av stamkulturer vara nödvändigt, i växthus eller laboratorium. Stamkulturerna bör förvaras under förhållanden som liknar testförhållandena, men bestrålningen och temperaturen kan sänkas för att minska underhållsfrekvensen (t.ex. om inga *Myriophyllum*-tester är inplanerade under en tid). Användning av större akvarier och krukor än för testerna rekommenderas för att ge utrymme för spridning. Sedimentets och vattenmediets sammansättning bör vara densamma som för testerna, även om alternativa metoder för gödning av sedimentet kan användas (t.ex. kommersiella långtidsverkande gödselmedel).

22. Stamväxterna ska vara fria från synliga föroreningar av andra organismer, inklusive sniglar, fintrådiga alger, svampar och insekter, t.ex. ägg eller larver av vattenaloemott *Parapoynx stratiotata* och larver eller vuxna exemplar av viveln *Eubrychius velutus*. Växterna kan behöva sköljas i sötvatten för att eliminera synliga föroreningar. Dessutom bör utvecklingen av föroreningar från encelliga alger och bakterier minimeras, även om växtmaterialet inte måste vara fullständigt sterilt. Stamkulturerna bör övervakas och omplanteras vid behov för att undvika utveckling av föroreningar från alger och bakterier. Stamkulturerna kan luftas om alg- eller bakterieangreppen blir problematiska.

23. Växterna ska alltid odlas/acklimatiseras under förhållanden som liknar, men inte nödvändigtvis är identiska med, de förhållanden som används under testet under en lämplig period (dvs.> 2 veckor) innan de används i ett test.

24. Blommande stamkulturer bör inte användas i tester eftersom tillväxttakten i allmänhet minskar under och efter blomning.

▼M7

Sediment

25. Följande syntetiska sediment, baserat på det syntetiska sediment som används i kapitel C.28 i denna bilaga (8), rekommenderas för detta test. Sedimentet framställs enligt beskrivningen i TM C.28, förutom tillsatsen av näringsämnen som beskrivs nedan:

a) 4–5 % torv (torrvikt, enligt 2 ± 0,5 % organiskt kol, så nära pH 5,5–6,0 som möjligt). Det är viktigt att använda torv i pulverform, finmald (företrädesvis med en partikelstorlek ≤ 1 mm), och uteslutande lufttorkad,

b) 20 % (torrvikt) kaolinlera (kaolinithalt helst över 30 %),

c) 75–76 % (torrvikt) kvartssand (till största del bestående av fin sand där mer än 50 % av partiklarna har storleken 50–200 μm).

d) Ett vattenhaltigt näringsmedium tillsätts så att halten av både ammoniumklorid och natriumfosfat i den slutliga sedimentsatsen uppgår till 200 mg/kg torrt sediment och fukthalten i den slutliga blandningen håller sig inom ett intervall på 30 till 50 %.

e) Kemiskt rent kalciumkarbonat $CaCO_3$) tillsätts för att justera den slutliga sedimentblandningens pH till 7,0 ± 0,5.

26. Källan till torven, kaolinleran och sanden ska vara känd och dokumenterad. Om ursprunget är okänt eller inger betänkligheter bör de respektive sedimentkomponenterna kontrolleras med avseende på avsaknaden av kemiska föroreningar (t.ex. tungmetaller, organiska klorföreningar, organiska fosforföreningar).

27. De torra beståndsdelarna i sedimentet bör blandas så att de bildar en enhetlig massa innan den vattenbaserade näringslösningen blandas in ordentligt i sedimentet. Den fuktiga sedimentet bör beredas minst två dagar före användning så att torven blötläggs ordentligt och hydrofoba torvpartiklar inte flyter upp till ytan när sedimentet täcks med mediet. Före användning kan det fuktiga sedimentet förvaras i mörker.

28. När testet ska påbörjas överförs sedimentet till behållare av lämplig storlek, t.ex. krukor med en diameter som passar i glaskärlen (sedimentets ytarea bör täcka omkring 70 % eller mer av kärlets ytarea). Om behållaren har hål i botten bör en bit filterpapper placeras i botten så att sedimentet inte läcker ur behållaren. Krukorna fylls med sediment så att sedimentytan är plan. Därefter täcks det med ett tunt skikt (~ 2–3 mm) av ett inert material, t.ex. sand, fint trädgårdsgrus (eller krossad korall), för att hålla sedimentet på plats.

Testmedium

29. Smart- och Barko-medier (12) rekommenderas för odling och testning av *Myriophyllum spicatum*. Beredningen av detta medium beskrivs i tillägg 1. Mediets pH-värde (vattenfasen) när testet inleds bör vara mellan 7,5 och 8,0 för optimal tillväxt.

Testets utformning

30. Testet bör omfatta minst sex likadana testkärl för den obehandlade kontrollen och minst fyra likadana testkärl för var och en av minst fem koncentrationsnivåer.

31. Om NOEC inte behöver bestämmas kan man ändra testupplägget så att antalet koncentrationer ökas medan antalet replikat per koncentration minskas.

▼M7

32. Varje testkärl representerar ett replikat som innehåller tre skott. Det finns två alternativ för att odla tre skott i varje testkärl:

— Testutformning A: ett skott per kruka och tre krukor per kärl.

— Testutformning B: tre skott per kruka och en kruka per kärl.

— Alternativa testutformningar med ett skott per kruka per testkärl är godtagbara under förutsättning att replikeringen justeras vid behov för att uppfylla erforderliga giltighetskriterier.

33. Provkärlen bör fördelas slumpmässigt mellan behandlingsgrupperna. Provkärlen måste placeras slumpmässigt i testområdet för att minimera inflytandet av rumsbetingade skillnader i ljusintensitet och temperatur.

Testkemikaliekoncentrationer och kontrollgrupper

34. Koncentrationerna bör normalt följa en geometrisk serie, separationsfaktorn mellan testkoncentrationerna bör inte överstiga 3,2. Förkunskap om testkemikaliens toxicitet från ett preliminärt test underlättar valet av lämpliga testkoncentrationer.

35. För att bestämma en EC_x-koncentration ska EC_x ligga innanför intervallet för testkoncentrationerna för att man ska uppnå en lämplig konfidensgrad. Om man t.ex. ska bestämma EC_{50} ska den högsta testkoncentrationen vara högre än värdet på EC_{50}. Om värdet på EC_{50} ligger utanför intervallet för testkoncentrationerna blir motsvarande konfidensintervall stora, och det kan då bli omöjligt att korrekt bedöma modellens statistiska lämplighet. Användningen av fler testkoncentrationer förbättrar konfidensintervallet runt det resulterande EG_x-värdet.

36. För att bestämma LOEC/NOEC (valfri endpoint), bör den lägsta testkoncentrationen vara tillräckligt låg så att tillväxten inte signifikant skiljer sig från kontrollväxternas tillväxt. Den högsta testkoncentrationen ska vara tillräckligt hög så att tillväxten är märkbart lägre än i kontrollen. Användning av flera replikat ökar den statistiska styrkan för NOEC/ANOVA-utformningar.

Limit-test

37. Under vissa omständigheter, t.ex. när ett preliminärt test tyder på att testkemikalien inte har några toxiska effekter vid koncentrationer upp till 100 mg/l eller upp till dess löslighetsgräns i testmediet (om denna är lägre), kan man utföra ett limit-test. Man jämför då responsen mellan en kontrollgrupp och en behandlingsgrupp, med en koncentration på 100 mg/l eller en koncentration som motsvarar löslighetsgränsen eller 1 000 mg/kg torrt sediment. Detta test bör utföras enligt de allmänna principerna för ett vanligt dos-responstest. En ökning av det minsta antalet replikat till sex provkärl per kontroll och koncentration rekommenderas dock. Tillväxten i kontrollgruppen och testgruppen kan analyseras med en statistisk metod för jämförelse av medelvärden, t.ex. t-test (Students t-test).

Testlösningar

38. Testlösningarna bereds vanligtvis genom utspädning av en stamlösning som bereds genom upplösning eller dispergering av testkemikalien i Smart- och Barko-medier med hjälp av demineraliserat (dvs. destillerat eller avjonat) vatten (se tillägg 1).

▼M7

39. Den högsta testkoncentrationen bör normalt inte överstiga testkemikaliens vattenlöslighet eller, när det gäller beredningar, dispergeringsgränsen enligt testbetingelserna.

40. För testkemikalier med låg vattenlöslighet kan det vara nödvändigt att bereda en koncentrerad stamlösning eller en dispersion med hjälp av ett organiskt lösningsmedel eller dispergeringsmedel för att underlätta tillsatsen av exakta mängder testkemikalie i testmediet och bidra till dispergeringen och upplösningen av kemikalien. Man bör därför så långt som möjligt undvika att använda sådana lösningsmedel eller dispergeringsmedel. Det får inte uppstå fytotoxicictet på grund av att man tvingas använda lösnings- eller dispergeringsmedel för att bereda testlösningen. Exempel på vanliga lösningsmedel som inte förorsakar fytotoxicitet vid koncentrationer upp till 100 µl/l är aceton och dimetylformamid. Om lösningsmedel eller dispergeringsmedel används bör deras slutkoncentrationer redovisas och begränsas till ett minimum (≤ 100 µl/l). Under sådana omständigheter bör alla behandlingar och kontroller (lösningsmedel) innehålla samma koncentration av lösningsmedel eller dispergeringsmedel. Obehandlade kontrollreplikat som inte innehåller lösningsmedel eller dispergeringsmedel tas också med i testutformningen. Ytterligare vägledning om användningen av dispergeringsmedel finns i ett av OECD:s vägledningsdokument (11).

TESTFÖRFARANDE

41. Testförfarandet varierar beroende på hur testkemikalien tillsätts (dvs. via vatten- eller sedimentfasen). Testkemikaliens sannolika beteende i vatten–sedimentsystemet bör övervägas som underlag för valet av exponeringssystem i testet (dvs. statisk exponering eller statisk förnyelse, spikat vatten eller spikat sediment). I vissa fall kan spetsade sedimenttester vara att föredra för kemikalier som förväntas fördelas till sediment i avsevärd utsträckning.

Etableringsfas

42. Friska skottspetsar/toppar, dvs. utan sidoskott, klipps av från odlingsväxterna för att få en skottlängd på 6 cm (± 1 cm). För testutformning A (ett skott per kruka och tre krukor per kärl) planteras enskilda skottoppar i varje kruka. För testutformning B (tre skott per kruka och en kruka per kärl) planteras fyra till fem skottspetsar i varje kruka med sediment.

43. I båda fallen bör extra krukor planteras så att ett urval av enhetliga växter kan väljas ut när testet inleds. De kan dessutom användas som reservväxter för att kontrollera rotväxten omedelbart före behandling och växterna kan skördas för mätningar av skottens biomassa och längd på dag 0.

44. Skotten planteras så att omkring 3 cm av skottet och minst två knutar finns under sedimentytan.

45. Krukorna överförs sedan till testkärlen under samma miljöförhållanden som under exponeringsfasen och förvaras i sju dagar i Smart- och Barko-medium för att framkalla rotutveckling.

46. Efter denna tid bör flera växter i reservkrukorna avlägsnas för kontroll av rotväxten. Om rotväxten inte är synlig (dvs. rotspetsar är inte synliga) bör etableringsfasen förlängas tills rotväxten är synlig. Detta steg rekommenderas för att säkerställa att plantorna växer aktivt vid den tidpunkt då testet inleds.

▼M7

Val av enhetligt växtmaterial

47. För testutformning A (ett skott per kruka och tre krukor per kärl) väljs enhetliga krukor ut innan testet inleds. För testutformning B (tre skott per kruka och en kruka per kärl) avlägsnas överskottsplantor så att tre plantor som är enhetliga i storlek och utseende finns kvar.

Exponering via vattenfasen

48. De krukor som valts ut för enhetlighet placeras i testkärlen enligt testutformningen. Smart- och Barko-medier tillsätts sedan till testkärlen. Var noga med att undvika störningar för sedimentet. För att undvika störningar kan mediet tillsättas hjälp av en tratt eller en plastskiva för att täcka sedimentet medan mediet hälls i testkärlen. Skivan måste dock avlägsnas omedelbart efteråt. Alternativt kan krukorna placeras i testkärlen efter det att mediet tillsatts. I båda fallen kan färskt medium användas i början av exponeringsfasen om det är nödvändigt för att minimera eventuell uppkomst av alger och bakterier eller för att möjliggöra beredning av enstaka testlösningssatser i replikaten.

49. Skottens längd över sedimentet mäts, antingen före eller efter tillsatsen av mediet.

50. Relevanta mängder av testkemikalien kan tillsättas testmediet innan de tillsätts testkärlen. Alternativt kan testkemikalien införas i mediet efter det att det har tillsatts testkärlen. I detta fall är det viktigt att säkerställa att testkemikalien fördelas homogent i hela testsystemet utan att störa sedimentet.

51. I samtliga registreras testmediets utseende (t.ex. klart, grumligt osv.) när testet inleds.

Exponering via sediment

52. Spikat sediment med vald koncentration bereds genom tillsättning av en lösning av testkemikalien direkt i nytt sediment. En stamlösning av testkemikalien upplöst i avjonat vatten blandas med det syntetiska sedimentet i en valskvarn, matningsblandare eller manuellt. Om den är svårlöslig i vatten kan testkemikalien lösas upp i minsta möjliga volym lämpligt organiskt lösningsmedel (t.ex. hexan, aceton eller kloroform). Denna lösning blandas sedan med cirka 10 g fin kvartssand för ett testkärl. Lösningsmedlet får avdunsta och därefter blandas sanden med lämplig mängd sediment per testbägare. Endast ämnen som avdunstar lätt får användas för att upplösa, dispergera eller emulgera testkemikalien. Man bör hålla i åtanke att volymen/vikten för den sand som spikas med testkemikalien måste beaktas när sedimentet bereds (dvs. sedimentet bör beredas med en mindre mängd sand). Man bör vara noga med att se till att testkemikalien som tillsätts sedimentet fördelas omsorgsfullt och jämnt i sedimentet.

53. Det spikade sedimentet fylls i krukorna (enligt beskrivningen ovan). Växter som valts ut för enhetlighet och har ett lämpligt rotsystem avlägsnas från de krukor som används under etableringsfasen och planteras om i det spikade sediment som beskrivs ovan.

54. Krukorna placeras i testkärlen enligt testutformningen. Smart- och Barko-medier tillsätts sedan försiktigt (med användning av en tratt), för att undvika störningar i sedimentet. Skottens längd över sedimentet mäts, antingen före eller efter tillsatsen av mediet.

▼M7

Upprätthållande av vattennivåer under testperioden

55. Den slutliga vattenvolymen ska registreras och vattennivån markeras på varje testkärl. Om vatten avdunstar med mer än 10 % under testet bör vattennivån justeras med destillerat vatten. Vid behov kan bägarna täckas löst med genomskinliga lock, t.ex. genomskinliga plastlock, för att minimera avdunstning och föroreningar från algsporer.

Testbetingelser

56. Lysrörsbelysning med varmt eller kallt vitt ljus används för att åstadkomma en ljusstrålning i ett intervall på ungefär 140 (± 20) $\mu E \cdot m^{-2} s^{-1}$, varvid intensiteten mäts inom ett fotosyntetiskt aktivt våglängdsområde (400–700 nm) vid vattenytan. Ljus-mörkerperioden ska vara 16:8 timmar. Ljusstrålningen får inte variera mer än ± 15 % över testytan.

57. Temperaturen i testkärlen ska vara 20 ± 2 °C.

58. Kontrollmediets pH får inte öka med mer än 1,5 enheter under testet. En avvikelse på mer än 1,5 gör dock inte testresultaten ogiltiga om det kan visas att de tidigare angivna kriterierna för testresultatens giltighet är uppfyllda.

Testets varaktighet

59. Exponeringsperioden är 14 dagar.

Mätningar och analytiska bestämningar

60. Efter etableringsfasen och omedelbart före behandling (dvs på dag 0) skördas reservväxter från fem slumpvis utvalda krukor för testutformningen med tre växter per kruka eller 15 krukor för testutformningen med en växt per kruka. Därefter utförs bedömningen av skottens längd samt färsk- och torrvikt enligt beskrivningen ovan.

61. När det gäller växter som överförs till exponeringsfasen görs följande bedömningar enligt tabell 1:

— Bedömningar av huvudskottets längd och antalet sidoskott och deras längd registreras åtminstone i slutet av exponeringsperioden (t.ex. på dag 14).

— Visuella bedömningar av växternas hälsa registreras åtminstone tre gånger under exponeringstiden (t.ex. dagarna 0, 7 och 14).

— Bedömningar av skottens färsk- och torrvikt görs i slutet av testet (dvs. på dag 14).

62. Skottlängden bestäms med hjälp av en linjal. Om det finns sidoskott registreras antalet och även deras längd mäts.

63. Visuella bedömningar av växternas hälsa görs genom att växternas utseende och testmediets allmänna tillstånd registreras. Följande iakttagelser bör noteras:

— Nekros, kloros eller annan missfärgning, såsom överdriven rödfärgning jämfört med kontrollväxterna.

— Utveckling av kontaminering från bakterier eller alger.

— Tillväxtstörningar, såsom dvärgväxt, förändrad internodlängd, förvridna skott/blad, spridning av sidoskott, tappade blad, förlorad turgor och splittring av stammen.

▼M7

— Visuella bedömningar av rötternas tillstånd görs i slutet av testet. Segmentet tvättas försiktigt bort från rötterna så att rotsystemet kan observeras. Nedan visas en föreslagen bedömningsskala i förhållande till kontrollväxterna:

1) inga rötter

2) få rötter

3) måttlig rotutveckling

4) mycket bra rotutveckling, jämförbar med kontroller

64. Bedömningar av färskvikten görs i början och slutet av testet. Skottet skärs av vid sedimentnivå och klappas torrt före vägning. Det är viktigt att avlägsna sedimentpartiklar som kan ha fastnat på skottets bas. Skottmaterialet placeras sedan i en torkugn vid cirka 60 °C och torkas till konstant vikt, före omvägning och registrering av torrvikten.

65. En sammanfattning av de biologiska bedömningar som minst krävs under testperioden ges i tabell 1.

Tabell 1

Bedömningsschema

Dag efter behandling (DEB)	*Myriophyllum spicatum*			
	Skottlängd, sidoskottens längd och antal	Visuell bedömning av skotten	Skottens färsk- och torrvikt Visuell bedömning av rötter	pH-värde O_2
0	A	A	A	A
4	—	—	—	—
7	—	A	—	A
14	A	A	A	A

A: anger att bedömningar krävs vid dessa tillfällen.
—: anger att mätningar inte krävs.

Mätfrekvens och analytiska bestämningar

66. Temperaturen hos mediet i ett kompletterande kärl med enbart testmedium som hålls under samma betingelser i odlingskammaren, inkubatorn eller klimatrummet ska registreras minst en gång per dag.

67. Testmediets pH och koncentration av upplöst syre bör kontrolleras för alla replikatkärl åtminstone när testet inleds, minst en gång under testet och i slutet av testet. Mätningarna bör alltid utföras vid samma tid på dagen. Om bulklösningar används för att bereda alla replikat för varje testkoncentration, är en enda mätning av varje bulklösning är godtagbar på dag 0.

68. Strålningen bör mätas i odlingskammaren, inkubatorn eller klimatrummet vid punkter som motsvarar vattenytans nivå. Mätningar bör göras minst en gång i början eller under testet. Metoden för detektering och mätning av ljuset, framför allt typen av ljussensor, påverkar mätvärdet. Sfäriska sensorer – som mäter ljuset från alla vinklar ovanför och under mätplanet – och sensorer av

▼M7

solsensortyp (med cosinuskoefficient för infallsvinkeln) – som mäter ljuset från alla vinklar ovanför mätplanet – är att föredra framför riktade sensorer. De förstnämnda sensorerna ger större mätutslag för en diffus ljuskälla av den typ som beskrivits här.

Analytiska mätningar av testkemikalien

69. Analytiska mätningar av testkemikalien bör göras för att säkerställa att testkemikaliekoncentrationerna appliceras korrekt.

70. Vattenprover bör samlas in för analysen av testkemikalien strax innan testet inleds (dvs. samma dag som de stabila testkemikalierna appliceras eller en timme efter appliceringen för kemikalier som inte är stabila) och i slutet av testet för alla testkoncentrationer.

71. Koncentrationerna i sedimentet och sedimentets porvatten bör bestämmas i början och slutet av testet, åtminstone i den högsta testkoncentrationen, om inte testkemikalierna är kända för att vara stabila i vatten (> 80 % av det nominella värdet). Mätningar i sedimentet och porvattnet är eventuellt inte nödvändiga om fördelningen av testkemikalien mellan vatten och sediment har bestämts noggrant under motsvarande betingelser (t.ex. förhållandet mellan sediment och vatten, applicering och sedimenttyp).

72. Provtagning av sedimentet när testet inleds kommer sannolikt att störa testsystemet. Därför kan ytterligare behandlade testkärl krävas för att underlätta analytiska bestämningar i början och slutet av testet. Om mellanliggande bedömningar anses vara nödvändiga, dvs. på dag 7, och analyserna kräver stora sedimentprover som är svåra att avlägsna från testsystemet bör de analytiska bestämningarna göras med hjälp av ytterligare testkärl som behandlas på samma sätt som de testkärl som används för biologiska bedömningar.

73. Centrifugering vid t.ex. 10 000 g och 4°C under 30 minuter rekommenderas för isolering av porvattnet. Om testkemikalien bevisligen inte absorberas på filter kan även filtrering godtas. I vissa fall är det kanske inte möjligt att analysera koncentrationerna i porvattnet om provet är för litet.

74. Vid semistatiska tester (dvs. exponering via vattenfasen) där koncentrationen av de relevanta testkemikalierna inte förväntas hålla sig inom 20 % av den nominella koncentrationen under testperioden utan förnyelse av testlösningar, bör använda och nyberedda testlösningar provtas för analyser av testkemikaliens koncentration vid varje förnyelse.

75. För test i vilka den uppmätta startkoncentrationen av testkemikalien inte ligger inom 20 % av den nominella koncentrationen men tillräckliga bevis kan framläggas för att visa att startkoncentrationerna är repeterbara och stabila (dvs. inom intervallet 80–120 % av startkoncentrationen), räcker det om kemiska bestämningar utförs enbart för de högsta och lägsta testkoncentrationerna.

76. Under alla omständigheter behöver bestämning av testkemikaliens koncentration bara göras för ett enda replikatkärl per testkoncentration. Alternativt kan testlösningarna i alla replikat för varje koncentration slås ihop för analyserna.

77. Om man kan visa att testkemikaliens koncentration har hållits inom 20 % av den nominella eller uppmätta startkoncentrationen genom hela testet kan analysen av resultaten och härledningen av endpoints baseras på nominella eller uppmätta startvärden.

▼M7

78. I dessa fall bör effektkoncentrationerna baseras på nominella eller uppmätta vattenkoncentrationer i början av testet.

79. Om det finns belägg för att koncentrationen har minskat genom hela testet (dvs. inte upprätthålls inom 20 % av den nominella eller uppmätta startkoncentrationen i den behandlade kammaren), bör analysen av resultaten i stället baseras på koncentrationens geometriska medelvärde under exponeringen eller på modeller som beskriver minskningen av koncentrationen av den undersökta kemikalien i den behandlade kammaren (11).

UTVÄRDERING AV DATA

80. Om användning av lösningsmedel/dispergeringsmedel är nödvändig kan data från lösningsmedelskontroller och obehandlade kontroller slås ihop för de statistiska analyserna, under förutsättning att responserna från lösningsmedelskontrollerna och de obehandlade kontroller inte skiljer sig på ett statistiskt signifikant sätt.

Responsvariabler

81. Syftet med testet är att bestämma testkemikaliens effekter på den testade artens vegetativa tillväxt, med användning av två responsvariabler, genomsnittlig specifik tillväxttakt och producerad mängd biomassa, enligt följande:

Genomsnittlig specifik tillväxthastighet

82. Denna responsvariabel baseras på förändringar i logaritmerna för skottets totala längd samt färsk- och torrvikt över tiden i kontrollerna och i varje behandlingsgrupp. Den beräknas för varje replikat i varje kontroll- och behandlingsgrupp. Genomsnittlig längd och vikt för de tre växterna per testkärl (replikaten) och tillväxttakten för varje replikat bör beräknas med hjälp av följande formel:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln (N_j) - \ln (N_i)}{t}$$

där

μ_{i-j} är genomsnittlig specifik tillväxthastighet från tidpunkten i till tidpunkten j,

N_i är värdet på mätvariabeln i prov- respektive kontrollkärlet vid tidpunkten i,

N_j är värdet på mätvariabeln i prov- respektive kontrollkärlet vid tidpunkten j, och

t är tidslängden mellan tidpunkterna i och j.

83. Från replikatens responser ska ett medelvärde för tillväxthastigheten liksom en uppskattning av variansen räknas fram för varje test- och kontrollgrupp.

84. Den genomsnittliga specifika tillväxthastigheten ska beräknas för hela tiden för testets genomförande (”i” i formeln betecknar början av tiden för testets genomförande, och ”j” slutet). Beräkna ett medelvärde av den genomsnittliga tillväxthastigheten för varje testkoncentration och kontrollgrupp tillsammans med variansskattningar.

▼M7

85. Den procentuella tillväxthämningen (I_r) beräknas sedan för varje testkoncentration (testgrupp) med formeln

$$\%I_r = \frac{(\mu_C - \mu_T)}{\mu_C} \times 100$$

där

% Ir är den procentuella minskningen av den genomsnittliga specifika tillväxthastigheten,

μC är medelvärdet av μ i kontrollgruppen, och

μT är medelvärdet av μ i testgruppen.

Producerad mängd biomassa

86. Denna responsvariabel baseras på förändringar av total längd, färskvikt och torrvikt för skottet över tiden i kontrollerna och varje behandlingsgrupp. Den genomsnittliga procentuella minskningen av den producerade mängden biomassa (% I_y) beräknas för varje testgrupp med formeln

$$\%I_y = \frac{(b_C - b_T)}{b_C}$$

där

% I_y är den procentuella minskningen av den producerade mängden biomassa,

b_C är den slutliga biomassan minus den initiala biomassan för kontrollgruppen, och

b_T är den slutliga biomassan minus den initiala biomassan för testgruppen.

Ritning av dos-respons-kurvor

87. Dos-respons-kurvor ska ritas som visar den genomsnittliga procentuella hämningen av responsvariabeln (I_r eller I_y) och logaritmen av testkemikaliens koncentration (I_r och I_y beräknas enligt ovan).

Bestämning av EC_x

88. Bestämningar av EC_x (t.ex. EC_{50}) ska baseras både på genomsnittlig specifik tillväxthastighet (E_rC_x) och på producerad mängd biomassa (E_yC_x). Dessa responsvariabler ska i sin tur bestämmas med hjälp av total färskvikt, total torrvikt och totallängd för skotten.

89. Observera att EC_x-värden som beräknats utifrån de två responsvariablerna inte är jämförbara, och att denna skillnad framgår när man tillämpar testresultaten. EC_x-värden som grundar sig på den genomsnittliga specifika tillväxthastigheten (E_rC_x) är oftast högre än de som grundar sig på den producerade mängden biomassa (E_yC_x) om de föreskrivna testbetingelserna i denna testmetod är uppfyllda, beroende på den matematiska grunden i respektive fall. Denna skillnad ska inte tolkas som en skillnad i känslighet mellan de två responsvariablerna, utan beror på att värdena är matematiskt olika.

Statistisk behandling

90. Målet är att bestämma det kvantitativa förhållandet mellan koncentration och respons med hjälp av regressionsanalys. Man kan använda viktad linjär regression efter att ha gjort en linjär transformation av responsdata, t.ex. till probit-, logit- eller Weibullvärden (13). Icke-linjära regressionsmetoder är dock att föredra, eftersom de är bättre anpassade för att hantera oundvikliga oregelbundenheter i data och avvikelser från jämna fördelningskurvor. I närheten av nollpunkten (ingen tillväxthämning) och fullständig tillväxthämning kan sådana oregelbundenheter bli uppförstorade genom linjäriseringen

▼M7

och därigenom störa analysen (13). Observera att standardmetoder för analys med probit-, logit- eller Weibulltransformationer är avsedda för dikotoma data (dvs. tvåpunktsfördelade data, såsom dödlighet–överlevnad) och därför bör modifieras för att kunna användas för data rörande tillväxthastighet eller producerad mängd biomassa. Speciella metoder för bestämning av EC_x-värden ur kontinuerliga data återfinns i (14), (15), (16) och (17).

91. För varje analyserad responsvariabel används förhållandet mellan koncentration och respons för att göra punktskattningar av EC_x-värden. Konfidensgränserna på 95 % för varje uppskattning bestäms och anpassningsgraden (”goodness of fit”) mellan responsdata och regressionsmodellen bör bestämmas antingen grafiskt eller statistiskt. Regressionsanalysen ska göras på responsvärden från enskilda replikat, inte på medelvärden från testgrupper.

92. När tillgängliga regressionsmodeller eller regressionsmetoder inte lämpar sig för de aktuella dataserierna kan skattningar av EC_{50}-värden och konfidensgränser också bestämmas genom linjär interpolation och bootstrapping (18).

93. För skattning av LOEC (och därmed även av NOEC) jämförs medelvärden från testlösningarna med hjälp av variansanalysmetoder (ANOVA). Medelvärdet för varje koncentration jämförs sedan med medelvärdet för kontrollerna med hjälp av en lämplig testmetod (t.ex. Dunnetts test, Williams test) (19) (20) (21) (22). Man måste avgöra om antagandet för ANOVA om normal distribution (ND) och variansens homogenitet (VH) är uppfyllt. Denna bedömning bör utföras med Shapiro-Wilks-testet (ND) eller Levene-testet (VH). Skulle antagandet om variansens homogenitet inte vara uppfyllt kan man ibland korrigera för detta genom logaritmisk transformation av data. Om variansens heterogenitet och/eller avvikelsen från ND är extrem och inte kan korrigeras genom transformation, bör analys med metoder som Bonferroni-Welch-t-testet, Jonkheere Terpstra-testet av step-down-typ och Bonferroni-median-testet övervägas. Mer information om bestämning av NOEC finns i (16).

RAPPORTERING

94. Testrapporten ska innehålla följande information:

Testkemikalie

Monokomponentämne:

— fysiskt utseende, vattenlöslighet och ytterligare relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper,

— kemiska beteckningar, såsom IUPAC- eller CAS-beteckning, CAS-nummer, SMILES- eller InChI-kod, strukturformel, renhet, kemisk beteckning på föroreningar i förekommande fall och om möjligt osv.

Multikomponentämne, UVCB-ämne och blandning:

— karakteriseras så långt som möjligt genom kemisk beteckning (se ovan), kvantitativ förekomst och relevanta fysikalisk-kemiska egenskaper hos beståndsdelarna.

testarter,

— vetenskaplig beteckning och källa,

testbetingelser,

— varaktighet och förhållanden under etableringsfasen,

— tillämpat testförfarande (statiskt, semistatiskt, pulserat),

▼M7

— testets startdatum och varaktighet,

— testmedium, dvs. sediment och flytande näringsmedium,

— beskrivning av testets utformning: växtkammare/växtrum eller laboratorium, testkärl och lock, lösningsvolymer, testplantornas längd och vikt per testkärl i början av testet, förhållandet mellan sedimentets yta och vattenytan, förhållande mellan sediment- och vattenvolym,

— testkoncentrationer (nominella respektive uppmätta värden) och antal replikat per koncentration,

— metoder för beredning av stam- och testlösningar, med uppgift om användning av lösnings- eller dispergeringsmedel,

— temperatur under testets gång,

— ljuskälla, bestrålning ($\mu E \cdot m^{-2} s^{-1}$),

— pH-värden hos test- och kontrollmedier samt testmediernas utseende vid testets början och slut,

— syrekoncentrationer,

— analysmetod med relevanta uppgifter för kvalitetsbedömning (kontroll av testresultatens giltighet, standardavvikelser eller konfidensgränser för analyserna),

— metoder för bestämning av mätvariabler, t.ex. längd, torrvikt, färskvikt,

— alla avvikelser från denna testmetod.

Resultat

— rådata: skottens längd och vikt per växter/kruka och andra mätvariabler i varje test- och kontrollkärl vid varje observation och analystillfälle enligt det bedömningsschema som anges i tabell 1,

— medelvärden och standardavvikelser för respektive mätvariabel,

— tillväxtkurvor för varje koncentration,

— dubbleringstid/tillväxtgrad i kontrollen baserat på skottens längd och färskvikt, inklusive variationskoefficienten för producerad mängd biomassa i färskvikt,

— beräknade responsvariabler för respektive testreplikat, inklusive medelvärden och variationskoefficient för replikaten,

— diagram över förhållandet mellan koncentration och tillväxthämmande effekt,

— uppskattningar av toxiska effektområden för responsvariabler t.ex. EG_{50} och tillhörande konfidensintervall. Om man räknat fram LOEC- och/eller NOEC-värden ska dessa anges, liksom de statistiska metoder som använts vid beräkningen,

— om ANOVA-metoder har använts: storleken på observerad effekt (t.ex. minsta signifikanta skillnad),

— eventuell tillväxtstimulans som har konstaterats i testlösningarna,

▼M7

— synliga tecken på fytotoxicitet samt observationer avseende testlösningarna,

— diskussion av resultaten, inbegripet eventuell inverkan på testresultatet som kan tillskrivas avvikelser från denna testmetod.

LITTERATURHÄNVISNINGAR

(1) Kapitel C.26 i denna bilaga: *Bestämning av tillväxthämning hos Lemna-arter (andmat)*.

(2) Kapitel C.3 i denna bilaga: Bestämning av tillväxthämning hos sötvattensalger och cyanobakterier

(3) Maltby, L. m.fl. (2010), Aquatic Macrophyte Risk Assessment for Pesticides, Guidance from the AMRAP Workshop in Wageningen (NL), den 14–16 januari 2008.

(4) Arts, G.H.P. m.fl. (2008), Sensitivity of submersed freshwater macrophytes and endpoints in laboratory toxicity tests, Environmental Pollution, vol. 153, s. 199–206.

(5) ISO 16191:2013 Water quality – Determination of the toxic effect of sediment on the growth behaviour of Myriophyllum aquaticum.

(6) Knauer, K. m.fl. (2006), Methods for assessing the toxicity of herbicides to submersed aquatic plants, Pest Management Science, vol. 62/8, s. 715–722.

(7) Kapitel C.50 i denna bilaga: Toxicitetstest utan sediment på *Myriophyllum spicatum*.

(8) Kapitel C.28 i denna bilaga: Toxicitetstest i sediment- och vattenfas på chironomid-larver med spikat vatten.

(9) Ratte, M., H. Ratte (2014), ”Myriophyllum Akut 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, nr 206, OECD Publishing, Paris.

(10) Davies, J. m.fl. (2003), Herbicide risk assessment for non-target aquatic plants: sulfosulfuron – a case study, Pest Management Science, vol. 59/2, s. 231–237.

(11) OECD (2000), ”Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures”, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, nr 23, OECD Publishing, Paris.

(12) Smart, R.M., J.W. Barko (1985), Laboratory culture of submersed freshwater macrophytes on natural sediments, Aquatic Botany, vol. 21/3, s. 251–263.

(13) Christensen, E.R., N. Nyholm (1984), Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves, Environmental Science Technology, vol. 18/9, s. 713–718.

(14) Nyholm, N. m.fl. (1992), Statistical treatment of data from microbial toxicity tests, Environmental Toxicology and Chemistry, vol. 11/2, s. 157–167.

(15) Bruce, R.D., D.J. Versteeg (1992), A statistical procedure for modelling continuous toxicity data, Environmental Toxicology and Chemistry, vol. 11/10, 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, nr 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, s. 1096–1121.

(20) Dunnett, C. W. (1964), New tables for multiple comparisons with a control, Biometrics, vol. 20/3, s. 482–491.

(21) Williams, D. A. (1971), A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control, Biometrics, vol. 27/1, s. 103–117.

(22) Williams, D. A. (1972), The comparison of several dose levels with a zero dose control, Biometrics, vol. 28/2, s. 519–531.

▼**M7**

Tillägg 1

SAMMANSÄTTNING HOS SMART- OCH BARKO-MEDIER

Komponent	Mängd reagens som tillsätts vattnet (*) (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 (jämviktsläge luft)	7,9

(*) Demineraliserat (dvs destillerat eller avjoniserat) vatten

▼M7

Tillägg 2

DEFINITIONER

Biomassa: färskvikt och/eller torrvikt av levande materia i en population. I detta test är biomassan summan av huvudskottet, alla sidogrenar och alla rötter.

Kemikalie: ett ämne eller en blandning.

Kloros: förändring hos testorganismens färg, från grön till gulfärgad, särskilt på kransarna.

Ecx: den koncentration av testkemikalien upplöst i vatten som inom en fastställd exponeringsperiod leder till en minskning på x % (t.ex. 50 %) av tillväxten hos *Myriophyllum spicatum* inom en angiven exponeringsperiod (omnämns uttryckligen vid avvikelse från fullständig eller normal testperiod). För att entydigt ange om EC-värdet bygger på tillväxthastighet eller producerad mängd biomassa används beteckningen E_rC för tillväxthastighet och E_yC för producerad mängd biomassa, åtföljt av mätvariabeln, t.ex. E_rC (huvudskottets längd).

Tillväxt: en ökning av mätvariabeln under testperioden, t.ex. huvudskottets längd, total längd för sidogrenar, total skottlängd, total rotlängd, färskvikt, torrvikt eller antal kransar.

Tillväxttakt: (genomsnittlig specifik tillväxthastighet) logaritmisk ökning av mätvariabeln under exponeringstiden. *Anmärkning:* Responsvariabler som är relaterade till tillväxttakten är inte beroende av testets varaktighet så länge tillväxtmönstret för oexponerade kontrollmekanismer är exponentiellt.

Lägsta koncentration med observerad effekt (**LOEC – "Lowest Observed Effect Concentration"**): den lägsta testade koncentration vid vilken man kan fastställa att testkemikalien har en statistiskt signifikant hämmande effekt på tillväxten (vid $p < 0,05$) inom en given exponeringstid, jämfört med kontrollen. Alla testkoncentrationer ovanför LOEC bör ha skadliga verkningar som är lika stora som eller större än de verkningar som observeras vid LOEC. Om dessa två villkor inte är uppfyllda bör en fullständig förklaring ges till hur man har valt LOEC (och därmed NOEC).

Mätvariabler: alla slags variabler som mäts för att uttrycka testets endpoint med hjälp av en eller flera responsvariabler. I denna testmetod är mätvariablerna huvudutskottets längd, total längd för sidogrenar, total skottlängd, total rotlängd, färskvikt, torrvikt eller antal kransar.

Monokultur: kultur bestående av en enda art.

Nekros: död vävnad (dvs. vit eller mörkbrun) hos testorganismen.

Nolleffektkoncentration (**NOEC** – "No Observed Effect Concentration"): testkoncentrationen omedelbart under LOEC.

Responsvariabel: variabel för bestämning av toxicitet. Variabeln fås fram genom att olika beräkningsmetoder tillämpas på uppmätta variabler för biomassa. I den aktuella metoden är tillväxthastighet och producerad mängd biomassa responsvariabler som beräknas med hjälp av mätvariabler såsom huvudskottets längd, total skottlängd, färskvikt, torrvikt eller antal kransar.

Semistatiskt testförfarande (med regelbunden förnyelse av testlösning): test där testlösningen byts med bestämda intervall under testet.

Statiskt testförfarande: testmetod utan regelbunden förnyelse av testlösningen under testet.

▼M7

Testkemikalie: varje ämne eller blandning som testas med denna testmetod.

Endpoint: den allmänna faktor som genom inverkan av en testkemikalie förändras jämfört med ett kontrollprov utan testkemikalie. I det aktuella testet är endpointen tillväxthämning, som kan uttryckas med olika responsvariabler baserade på en eller flera mätvariabler.

Testmedium: syntetiskt odlingsmedium i vilket testplantorna växer när de exponeras för testkemikalien. Testkemikalien är vanligen löst i testmediet.

UVCB-ämne: ämne med okänd eller varierande sammansättning, komplexa reaktionsprodukter eller biologiskt material.

Producerad mängd biomassa: värdet på en mätvariabel i slutet av exponeringstiden minus motsvarande värde i början av exponeringstiden. Obs: Om tillväxtmönstret för oexponerade organismer är exponentiellt minskar responsvariabler som är baserade på producerad mängd biomassa under testets varaktighet.